

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

E.A.P. DE MEDICINA VETERINARIA

**Concordancia entre las pruebas de inhibición de la
hemoaglutinación (hi) y Elisa, en la detección de
anticuerpos contra el virus de la enfermedad de
Newcastle en pollos de engorde**

TESIS

Para optar por el título profesional de Médico Veterinario

AUTOR

Carolina Cajacuri Moreno

Lima – Perú

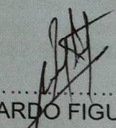
2014



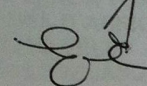
UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA
Facultad de Medicina Veterinaria
ESCUELA ACADÉMICO-PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA

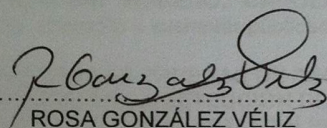
Trabajo sustentado y aprobado ante el Jurado designado por la Escuela Académico Profesional de Medicina Veterinaria mediante Resolución Directoral N° 187-EAPMV/FMV-2014

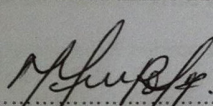
PRESIDENTE :


EDGARDO FIGUEROA TERRY

MIEMBROS :

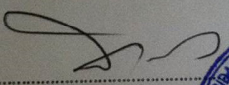

ELIANA ICOCHEA D'ARRIGO
Asesora de la Tesis


ROSA GONZÁLEZ VÉLIZ


MERCY RAMÍREZ VELÁSQUEZ

San Borja, 17 de diciembre de 2014

V° B°


MV. DIEGO DÍAZ COAHILA
Director de la Escuela Académico Profesional de
Medicina Veterinaria





ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO

En el auditorio principal de la Facultad de Medicina Veterinaria, el día miércoles 17 de diciembre de 2014, a las 12:00 horas, se constituyó el Jurado Examinador designado mediante Resolución Directoral N° 187-EAPMV/FMV-2014, integrado por los siguientes profesores:

EDGARDO FIGUEROA TERRY	Presidente del Jurado
ELIANA ICOCHEA D'ARRIGO	Asesora de la Tesis
ROSA GONZÁLEZ VÉLIZ	Miembro del Jurado
MERCY RAMÍREZ VELÁSQUEZ	Miembro del Jurado

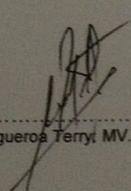
Luego de la instalación del Jurado, a cargo del Presidente del Jurado y bajo la dirección del mismo, la Bachiller Doña: CAJACURI MORENO, CAROLINA, para optar el Título Profesional de Médico Veterinario, procedió a sustentar públicamente la Tesis:

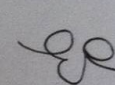
**"CONCORDANCIA ENTRE LAS PRUEBAS DE INHIBICIÓN DE LA
HEMOAGLUTINACIÓN (HI) Y ELISA, EN LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA
EL VIRUS DE LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE EN POLLOS DE ENGORDE"**

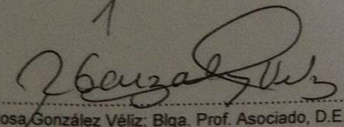
Luego de absolver las preguntas del Jurado y del público asistente, el Jurado deliberó con la abstención reglamentaria del Asesor de la Tesis y acordó su APROBACIÓN por UNANIMIDAD, otorgándole la nota de **DIECINUEVE (19)**.

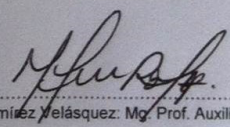
Habiéndose aprobado la sustentación pública de la Tesis, el Presidente en representación del Jurado recomienda que la Escuela Académico Profesional de Medicina Veterinaria proponga la aprobación del TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO a la Facultad de Medicina Veterinaria y que ésta proponga al Rectorado el otorgamiento respectivo.

Siendo las **12:40 horas**, concluyó el acto académico de sustentación pública de Tesis en fe de lo cual suscriben la presente acta por cuadruplicado los integrantes del Jurado:


Edgardo Figueroa Terry, MV. Prof. Principal, D.E.


Eliana Icochea D'Arrigo, Mg. Prof. Principal, T.C.


Rosa González Véliz, Bga. Prof. Asociado, D.E.


Mercy Ramírez Velásquez, Mg. Prof. Auxiliar, D.E.



DEDICATORIA

A todos aquellos animalitos que
dan su vida por servir al hombre.

AGRADECIMIENTOS

GRACIAS SEÑOR POR
TODAS LAS PERSONAS QUE A LO
LARGO DE MI VIDA ME HAN
LLEVADO HASTA TI.

ÍNDICE

	Pág
ABREVIATURAS	i
RESUMEN	ii
ABSTRACT	iii
LISTA DE CUADROS	iv
LISTA DE GRÁFICOS	v
LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE ANEXOS	vii
I.INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
Enfermedad de Newcastle	4
Historia	4
Definición	6
Etiología	7
Clasificación de Cepas	8

Estructura y morfología	9
Actividad biológica	10
Replicación viral	11
Resistencia a agentes físicos y químicos	11
Epidemiología	12
Distribución e Incidencia	12
Hospederos	13
Transmisión y diseminación	13
Signos clínicos	15
Patología	17
• <i>Lesiones Macroscópicas</i>	17
• <i>Lesiones Microscópicas</i>	17
Inmunidad	18
Diagnóstico	19
• Aislamiento viral	19
• Serología	19
• Diagnóstico diferencial	22
 III. MATERIALES Y MÉTODOS	 24
Lugar y tiempo de Estudio	24
Muestras	24
Materiales de Laboratorio	25
Prueba de Inhibición de la Hemoaglutinación (HI)	25
Prueba de Inmunoensayo con Enzimas asociadas (ELISA)	25

Instrumentos y Equipos	26
Método de evaluación	26
Colección de Muestras	26
• Detección de anticuerpos para el vENC por la prueba de HI	27
• Detección de anticuerpos para el vENC por la prueba de ELISA	29
Análisis de Datos	31
IV. RESULTADOS	33
• Concordancia entre los resultados de ELISA e Inhibición de la Hemoaglutinación (HI-cepa respiratoria La Sota)	33
• Concordancia entre los resultados de ELISA e Inhibición de la Hemoaglutinación -cepa Entérica	36
• Concordancia entre los resultados de Inhibición de la Hemoaglutinación (HI)-cepa respiratoria La Sota e Inhibición de la hemoaglutinación (HI)- cepa tropismo entérica	38
V. DISCUSIÓN	41
VI. CONCLUSIÓN	46
VII. LITERATURA CITADA	47
VIII. ANEXOS	57

ABREVIATURAS

ENC:	Enfermedad de Newcastle
OIE:	Oficina Internacional de Epizootias
OMSA:	Organización Mundial de Sanidad Animal (Antes OIE)
SENASA:	Servicio Nacional de Sanidad Agraria.
vENC:	virus de la Enfermedad de Newcastle
ARN:	Ácido ribonucleico
NP:	Nucleoproteína
Proteína F:	Proteína de Fusión.
Proteína M:	Proteína de la Matriz.
HN:	Hemaglutinina neuraminidasa.
HA:	Hemoaglutinación.
HI:	Inhibición de la Hemoaglutinación.
PAMV-1:	Paramixovirus Aviar Tipo 1
ICPI:	Índice de Patogenicidad Intracraneana
ADN:	Ácido Desoxirribonucleico.
FAO:	Food and Agriculture Organization of the United Nations
VVND:	Enfermedad de Newcastle Velogénico Viscerotrópico
NVND:	Enfermedad de Newcastle Velogénico Neurotrópico.
APA:	Asociación Peruana de Avicultura.

RESUMEN

Las pruebas serológicas de Inhibición de la Hemaglutinación (HI) y la Prueba de Inmunoensayo con enzimas asociadas (ELISA) son usadas rutinariamente para la detección de anticuerpos contra el virus de la Enfermedad de Newcastle (vENC). El antígeno de la prueba de HI puede ser una cepa de tropismo respiratorio o de tropismo entérico. En el presente estudio fue analizada la concordancia entre las dos pruebas de HI y la prueba de ELISA. Con tal fin fueron analizados los resultados serológicos obtenidos en 196 sueros colectados en pollos de engorde de 26 y 42 días, antes y después de ser desafiados con una cepa velogénica viscerotrópica del virus de la enfermedad de Newcastle. Los anticuerpos detectados por ambas pruebas fueron agrupados en cuatro escalas según su nivel de detección (negativo, bajo, medio y alto) para posteriormente ser analizados por la prueba estadística de Kappa de Cohen. Se analizó la concordancia entre las dos pruebas de HI con antígeno respiratorio o entérico y, entre cada una de estas últimas (HI respiratoria y HI entérica) con la prueba de ELISA. Se determinó que la concordancia entre las prueba de HI y ELISA, tanto usando antígeno entérico como antígeno respiratorio fue muy pobre, mientras que la concordancia entre las dos pruebas de HI (con antígeno respiratorio o entérico) fue moderada.

Palabras claves: virus de la enfermedad de Newcastle (ENC), ELISA, HI, índice de kappa, concordancia.

ABSTRACT

Hemagglutination Inhibition (IH) and Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) Serological tests are routinely used for antibodies detection against the virus of Newcastle disease (NDV). Antigen for IH test may be a strain of respiratory tropism or enteric tropism. This study analyzed the concordance between the HI and ELISA tests. For this purpose, the serological results obtained on 196 sera collected in broilers of 26 and 42 days old were analyzed, before and after being challenged with a velogenic viscerotropic strain of newcastle disease virus. The antibodies detected by both tests were grouped into four scales according to their detection level (negative, low, medium and high) in order to later be analyzed by the Kappa Cohen statistic test. Concordance between the two tests of IH with respiratory or enteric antigen was analyzed, and concordance between each these (IH respiratory and IH enteric) with the ELISA test was analyzed. It was found that the concordance between IH test and ELISA, using both enteric antigen and respiratory antigen was very poor, while the concordance between the two IH tests (respiratory or enteric antigen) was moderate.

Keywords: virus Newcastle disease (NDV), ELISA, HI, kappa index, concordance.

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Valores de clasificación referenciales para los resultados del análisis de concordancia de Kappa. **Pag. 31**

Cuadro 2. Distribución de los resultados de serología mediante ELISA e Inhibición de la hemaglutinación (HI) – cepa La Sota, a partir de muestras de suero de aves al día 26 (n=98). **Pag. 32**

Cuadro 3. Distribución de los resultados de serología mediante ELISA e Inhibición de la hemaglutinación (HI) – cepa La Sota, a partir de muestras de suero de aves al día 42 (n=98). **Pag. 34**

Cuadro 4. Distribución de los resultados de serología mediante ELISA e Inhibición de la Hemaglutinación (HI) – cepa Enterica, a partir de muestras de suero de aves al día 26 (n=98). **Pag. 34**

Cuadro 5. Distribución de los resultados de serología mediante ELISA e Inhibición de la Hemaglutinación (HI) – cepa Enterica, a partir de muestras de suero de aves al día 42 (n=98). **Pag. 36**

Cuadro 6. Distribución de los resultados de serología mediante Inhibición de la Hemaglutinación (HI) – cepa La Sota e Inhibición de la Hemaglutinación (HI) – cepa Enterica, a partir de muestras de suero de aves al día 26 (n=98). **Pag. 37**

Cuadro 7. Distribución de los resultados de serología mediante Inhibición de la Hemaglutinación (HI) – cepa La Sota e Inhibición de la Hemaglutinación (HI) – cepa Enterica, a partir de muestras de suero de aves al día 42 (n=98). **Pag. 39**

Cuadro 8. Distribución de los resultados de serología mediante Inhibición de la Hemaglutinación (HI) – cepa La Sota e Inhibición de la Hemaglutinación (HI) – cepa Enterica, a partir de muestras de suero de aves al día 42 (n=98). **Pag. 39**

LISTA DE GRAFICAS

Gráfica 1. Representación gráfica mediante Boxplots (diagrama en cajas) para los valores de mediana y percentiles a partir de los niveles de seroconversión obtenidos mediante ELISA e Inhibición de la Hemaglutinación – cepa la Sota (formato de gráfica Stata 12.0).

Pag. 35

Gráfica 2. Representación gráfica mediante Boxplots (diagrama en cajas) para los valores de mediana y percentiles a partir de los niveles de seroconversión obtenidos mediante ELISA e Inhibición de la Hemaglutinación (HI) – cepa Enterica (formato de gráfica Stata 12.0). **Pag.38**

Gráfica 3. Representación gráfica mediante Boxplots (gráfica en cajas) para los valores de mediana y percentiles a partir de los niveles de seroconversión obtenidos mediante Inhibición de la Hemaglutinación (HI) – cepa La Sota e Inhibición de la Hemaglutinación (HI) – cepa Enterica (Formato de gráfica Stata 12.0). **Pag. 40**

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática de la estructura del vENC. **Pag. 10**

Figura 2. Vías de transmisión del virus de la enfermedad de Newcastle. **Pag. 15**

Figura 3. Signos clínicos producidos por el virus de la enfermedad de Newcastle. **Pag. 16**

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Tabla 1. Resultados serológicos obtenidos al día 26 del estudio (pre desafío), por las pruebas de HI (antígeno entérico y respiratorio) y la prueba de ELISA. **Pag. 58**

Anexo 2. Tabla 2. Resultados serológicos obtenidos al día 42 del estudio post desafío, por las pruebas de HI y la prueba de ELISA. **Pag. 62**

I.- INTRODUCCION

La Enfermedad de Newcastle (ENC), es una de las enfermedades que afecta a la avicultura comercial a nivel mundial. La naturaleza y magnitud de la enfermedad varía entre países (King, 1999); sin embargo, continua siendo una de las principales entidades patológicas más importantes debido a su elevada morbilidad y mortalidad, ocasionando numerosas pérdidas económicas en la industria avícola (Aldous *et al.*, 2008).

La Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), llamada anteriormente Oficina Internacional de Epizootias, establece a la ENC como uno de los mayores riesgos para el intercambio comercial internacional de aves y productos de origen aviar, incluyéndola dentro de la lista única de enfermedades notificables (Miller *et al.*, 2012).

En el Perú, entre los años 1987 y 1992 la ENC no representaba mayor problema para la avicultura; pero a partir de 1994 empezaron a suscitarse casos violentos de la enfermedad. Estos casos comprometieron plantales de aves comerciales, pero principalmente afectaron a numerosos criadores de aves de pelea que no usaban la vacunación contra la ENC (Chang, 1998).

La ENC es prevalente en el Perú, principalmente en aves de riña y de traspatio. Se ha reportado el aislamiento de Paramixovirus Aviar -1 en aves silvestres con una prevalencia muy baja y con cepas de tipo lentogénicas, considerándose estos aislamientos como de riesgo mínimo para las aves domésticas (Ventocilla *et al.*, 2011).

En los últimos años, las estadísticas de los diagnósticos del Laboratorio de Patología Aviar de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos y los reportes del Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA), indican la presencia del virus en nuestro país, tal como se informó sobre brotes de la enfermedad ocurridos en el mes de septiembre del presente año, donde se confirmó la presencia de ocho casos distribuidos en los departamentos de Lima (06 casos) y Ancash (02 casos), todos reportados en aves de pelea en predios de traspatio (zonas interiores, que suele encontrarse al fondo o detrás del patio principal de las casas en zonas rurales o en azoteas de la ciudad). En la actualidad no se tiene ningún reporte o confirmación en aves de granjas comerciales a nivel nacional (SENASA, 2014).

La serología es usada con dos fines, para evaluar la protección vacunal de las aves contra este agente y, como medio de diagnóstico de retos por cepas patógenas de campo. Las pruebas serológicas más comúnmente usadas son: la prueba de ELISA y la prueba de HI, sin embargo como las vacunas vivas pueden contener antígenos con tropismo entérico o respiratorio, se ha señalado que la respuesta humoral a las vacunaciones por las pruebas de HI, puede variar en función del tipo de antígeno usado como vacuna. De otro lado existen diferentes escenarios de evaluación de respuesta serológica: Aves vacunadas y no desafiadas o aves vacunadas y desafiadas con un virus patógeno velogénico viscerotrópico de la enfermedad.

Actualmente la interpretación de los resultados se realiza solo teniendo en cuenta el programa de vacunación de las aves, sin considerar las posibles variaciones indicadas, por lo que es

necesario conocer si la respuesta inmune para HI varía cuando se usan antígenos con diferente tropismo o, si existe concordancia entre los resultados de los dos tipos de pruebas HI y ELISA en los escenarios indicados. Por lo tanto el objetivo de la presente tesis fue determinar la concordancia entre las dos pruebas de HI con antígeno respiratorio o entérico y, entre cada una de estas últimas (HI respiratoria y HI entérica) con la prueba de ELISA, lo que permitirá establecer parámetros de interpretación de resultados a dichas pruebas tanto en monitoreos o luego de la exposición a vacunas y desafíos experimentales o de campo.

II.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 ENFERMEDAD DE NEWCASTLE

2.1.1 Historia

En el año 1926 en Java, Indonesia se registraron los primeros brotes de una enfermedad que afectaba a las aves de corral, ocasionando numerosas pérdidas por la alta morbilidad y mortalidad que presentaba. En otoño de ese mismo año un barco transporta la enfermedad hasta la ciudad de Inglaterra. Es así que se propaga a lo largo de la costa norte de Inglaterra, alrededor de la localidad de Newcastle, de donde toma el nombre de Enfermedad de Newcastle (EN) por el condado donde inicialmente incidió (Doyle, 1927). La EN ha sido informada en numerosos países y regiones de todos los continentes, sin embargo, se reportaron brotes de cuadros compatibles con dicha enfermedad, previos a 1926 (Suarez, 2013).

Se considera que se han presentado cuatro o más panzootias de la ENC (Abolnik *et al.*, 2004). La primera, abarcó desde el brote inicial en 1926 hasta cerca de los años 60, y se originó en el sudeste asiático con una lenta diseminación hacia Europa. La segunda, a diferencia de la primera,

tuvo una rápida diseminación y comenzó a finales los años 60 hasta el año 1973. La difusión más rápida de la enfermedad en estos años estuvo influenciada por el mayor desarrollo de la industria avícola, con un considerable aumento en el comercio internacional. El virus responsable de esta panzootia estuvo asociado con la importación de psitácidas (Walker *et al.*, 1973), la cual provocó el desarrollo de vacunas y medidas para la protección de la industria avícola, entre las cuales se incluían nuevas regulaciones para la importación de aves exóticas. La tercera panzootia se inició a finales de los años 70 en el medio Oriente. La especie de ave inicialmente afectada fue la paloma doméstica, que no había sido considerada importante en la epizootiología de la enfermedad, lo que permitió una rápida diseminación de la ENC a Europa y otras partes del mundo debido al contacto entre aves de competencia y ornamentales y al gran comercio internacional con tales aves (Alexander *et al.*, 2012). La diseminación de la enfermedad a los pollos produjo en Europa numerosos brotes como resultado de la comida contaminada por heces de palomas infectadas. En la actualidad, se reconoce que la enfermedad se mantiene controlada, pero de forma enzoótica en esta especie, en muchos de los países afectados (Barbezange *et al.*, 2003).

Desde finales del año 1996 hasta la actualidad se han presentado numerosos brotes de la enfermedad en diversas partes del mundo, que según varios autores (Abolnik *et al.*, 2004; FAO, 2004), constituyen elementos suficientes para que se les considere la cuarta panzootia de la ENC, la cual afecta además de muchos países, a Australia, país que era libre de la enfermedad desde los años 1930-1932 (Westbury, 2001).

El virus de la Enfermedad de Newcastle (vENC) fue aislado por primera vez en 1926 y por 30 años permaneció como el único Paramixovirus aviar (PMVA) reconocido. Sin embargo, desde los primeros años de la década de los 70s se realizaron innumerables aislamientos de Paramixovirus serológicamente diferentes al vENC, a partir de especies aviares (Alexander *et al.*, 2012).

La ENC representa el mayor impedimento para la producción de pollos en países en vías de desarrollo. No solo los países con industrias avícolas desarrolladas experimentan grandes pérdidas por brotes, medidas de control, vacunaciones, entre otros, también países libres de la enfermedad invierten en análisis y pruebas para mantener un estatus adecuado para la comercialización. En los países donde la ENC es endémica, representa un importante factor limitante en el desarrollo de la producción avícola comercial (SENASA Arg, 2004).

Debido a su importancia en el mercado avícola internacional por los brotes que pueden afectar el comercio, la Oficina Internacional de Epizootias cambió la definición de la enfermedad que ahora incluye en su reporte infecciones por virus de moderada y de alta virulencia, mientras que la definición anterior solo incluía las infecciones por cepas altamente patógenas (OIE, 2012).

2.1.2 Definición

La enfermedad causada por este virus, tomó temporalmente el nombre de “Enfermedad de Newcastle”, debido al lugar donde se reportó por primera vez la enfermedad en su forma clínica. La ENC ha sido llamada también pseudopeste aviar, pseudoplagia aviar, distemper aviar y neumoencefalitis, y es reconocida mundialmente como la “Primera Plaga de los Pollos” (Doyle, 1927; Miller *et al.*, 2012). La enfermedad continúa siendo llamada ENC, sin embargo, en los últimos años se le conoce también por el nombre de Paramixovirus Aviar serotipo 1 (PMVA-1) por el serotipo que la ocasiona (Alexander *et al.*, 2012).

La ENC velogénica viscerotrópica también es conocida con el nombre de Enfermedad de Newcastle Exótica. Aunque otros autores consideran el término ENC exótica a la ocasionada por una cepa que no es endémica al país o a la zona en donde ha sido detectada (Wise *et al.*, 2004).

En la actualidad la OIE define a la ENC como la infección de aves causada por un PMVA-1 si cumple uno de los siguientes criterios de virulencia:

- a. El virus tiene un Índice de Patogenicidad Intracraneal (ICPI, por sus siglas en inglés) en pollos de 1 día de edad (*Gallus gallus*) de 0.7 o superior.
- b. Se han demostrado en el virus múltiples aminoácidos básicos (o directamente o por deducción) en el extremo C-terminal de la proteína F2 y fenilalanina en el residuo 117, la cual está en el extremo N-terminal de la proteína F1. El término “múltiples aminoácidos básicos” se refiere a que existen al menos tres residuos de arginina o lisina entre las posiciones 113 y 116. La imposibilidad de demostrar el modelo característico de residuos de aminoácidos como se ha descrito anteriormente requeriría la caracterización del virus aislado mediante una prueba de ICPI.

En esta definición, los residuos de aminoácidos se numeran desde el extremo N-terminal de la secuencia de aminoácidos deducida a partir de la secuencia de nucleótidos del gen F0 donde las posiciones 113 a 116 corresponden a las posiciones -4 a -1 a partir del punto de escisión (OIE, 2012).

2.1.3 Etiología

El vENC se ubica dentro del género Avulavirus subfamilia Paramixovirinae, familia Paramyxoviridae, orden Mononegavirales (ICTV, 2012). Existen 11 serotipos de paramixovirus aviar (PMVA-1 a PMVA-11), los cuales fueron agrupados sobre las bases de su afinidad antigénica por la prueba de HI, perteneciendo el vENC al serotipo 1 (Briand *et al.*, 2012; Miller *et al.*, 2010).

Las cepas de PMVA-1 se clasifican en tres patotipos basados en su virulencia en pollos. Las cepas lentogénicas son las menos virulentas, las mesogénicas son moderadamente virulentas, y las velogénicas son las más virulentas. La mayoría de las cepas se agrupan en los extremos de

virulencia y son o lentogénicas o velogénicas. Los virus velogénicos se pueden subdividir en una forma neurotrópica, que esta típicamente asociada con signos respiratorios y neurológicos y en una viscerotrópica asociada con lesiones intestinales hemorrágicas. Estas formas clínicas se superponen y rara vez son evidentes, incluso en pollos libres de un patógeno específico (SPF) (Alexander *et al.*, 2012).

2.1.3.1 Clasificación de Cepas:

Todas las cepas de la ENC pertenecen a un mismo serotipo por no presentar variabilidad antigénica. Sin embargo, si presentan variabilidad en su patogenicidad y son clasificadas como consecuencia, de acuerdo a las formas clínicas de la enfermedad (Absalon *et al.*, 2012; Ahmed *et al.*, 2007; Abolnik *et al.*, 2004):

- a. ***Virus Velogénico Viscerotrópico:*** Es una forma muy patógena en la que se observan frecuentemente lesiones intestinales hemorrágicas;
- b. ***Virus Velogénico Neurotrópico:*** Se presenta con mortalidad elevada, habitualmente después de signos respiratorios y nerviosos;
- c. ***Virus Mesogénico:*** Se presenta con signos respiratorios y signos nerviosos ocasionales pero con baja mortalidad;
- d. ***Virus Lentogénico o respiratorio:*** Se presenta con una infección respiratoria leve o subclínica;
- e. ***Entérico Asintomático:*** Normalmente consiste en una infección entérica subclínica.

Los signos clínicos de la enfermedad clínica varía ampliamente en pollos y el diagnóstico puede complicarse posteriormente por respuestas diferentes a la infección en los distintos hospedadores, los signos clínicos por si solos no son fiables para el diagnóstico de la ENC. Sin embargo, los signos clínicos y las lesiones asociadas con los patotipos virulentos proporcionan una fuerte sospecha de enfermedad (OIE, 2012).

2.1.4 Estructura y morfología

Los Paramixovirus Avirares son virus ARN con genoma de hebra simple, no segmentado, de sentido negativo. Las partículas virales son bastante pleomórficas, generalmente son redondeadas y miden entre 100 – 500nm de diámetro, aunque se pueden encontrar en forma filamentosas de aproximadamente 100 nm de ancho y de longitudes variables (Mast *et al.*, 2009). Al microscopio electrónico, se puede observar la cápside en forma de espina de pescado de aproximadamente 18 nm de ancho y un grado de inclinación de 5 nm, y tiene simetría helicoidal. En la cubierta de la partícula del virus se observa proyecciones de alrededor de 8 nm de extensión, las cuales son llamadas glicoproteínas de superficie. Estas, son dos glicoproteínas de superficie la Hemaglutinina-Neuraminidasa (proteína HN) y la proteína de fusión (F) helicoidal (Mast *et al.*, 2009). El virus posee una envoltura lipídica, que representa el 25% del peso total del virus, lo cual hace que sea inactivado rápidamente por solventes orgánicos o agentes con actividad de superficie y los carbohidratos representan el 6% del peso total del virus. La molécula de ARN tiene aproximadamente 15 186 nucleótidos. Al igual que los demás paramixovirus el orden de las proteínas en el genoma viral es el siguiente: 3' NP-P-M-F-HN-L '5 (Lamb *et al.*, 2007).

El genoma del vENC codifica 6 proteínas estructurales (ICTV, 2012). De estas, las principales se detallan a continuación:

- a. **Proteína L:** RNA polimerasa asociada directamente a la nucleocápside del virus.
- b. **Proteína HN:** Responsable de la actividad hemaglutinina y neuroaminidasa.
- c. **Proteína F:** Conocida como proteína de fusión.
- d. **Proteína N:** Proteína de nucleocápside.
- e. **Proteína P:** Proteína fosforilada, también asociada a la nucleocápside.
- f. **Proteína M:** Proteína matriz.

2.1.5 Actividades Biológicas

- a. **Actividad Hemoaglutinante:** La habilidad del vENC y de otros paramixovirus es la de aglutinar a los glóbulos rojos, debido a la unión de la proteína de superficie viral Hemaglutinina – Neuroaminidasa (HN) con los receptores de los glóbulos rojos. Esta cualidad es empleada para el diagnóstico de la enfermedad (Ito *et al.*, 1999).
- b. **Actividad Neuroaminidasa:** Habilidad de eludir gradualmente los eritrocitos aglutinados dados por la otra porción de la proteína HN (Lamb *et al.*, 2007).
- c. **Fusión celular y Hemolisis:** La proteína F es la responsable de la adhesión de la membrana viral a la membrana de la célula huésped durante el ciclo de replicación viral. Dada la rigidez de la membrana del eritrocito del ave, esta fusión generalmente resulta en una lisis celular o hemolisis (Lamb *et al.*, 2007).

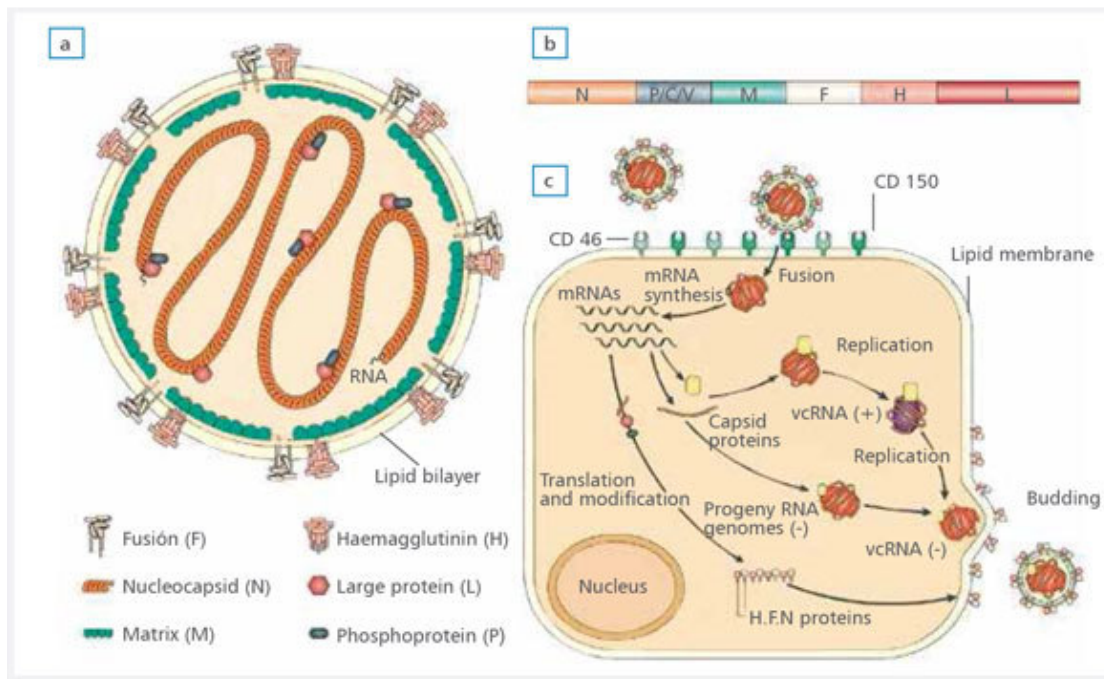


Figura 1. (a) Representación esquemática de la estructura del vENC. (b) Organización del genoma viral. (c) Ciclo de replicación del vENC. Fuente: CEVA, 2013.

2.1.6 Replicación Viral

La entrada del virus es posiblemente dependiente del colesterol y esto puede ocurrir a través del proceso de endocitosis (Martins *et al.*, 2012). La replicación del virus se inicia cuando la proteína HN del virus se une al receptor de la célula huésped y desencadena la actividad de la proteína F, que fusiona la membrana del virus con la membrana de la célula hospedera permitiendo que el complejo de la nucleocápside ingrese a la célula huésped (Cantin *et al.*, 2007).

Los paramixovirus se replican enteramente en el citoplasma. La replicación comienza cuando la ARN polimerasa ARN dependiente (L) que se encuentra dentro del virus es liberada en el citoplasma, dando inicio a la producción de transcriptasas complementarias de sentido positivo que actúan como ARN mensajeros y utilizan los mecanismos celulares para la producción de proteínas y del genoma viral. Las proteínas virales sintetizadas en la célula infectada son transportadas a la membrana celular de la célula huésped donde se alinean para su incorporación dentro de la nucleocápside, formándose el virión. Posteriormente, ocurre la liberación de los viriones por exocitosis (Alexander *et al.*, 2012).

2.1.7 Resistencia a agentes físicos y químicos

La infectividad del vENC y de otros paramixovirus aviares puede ser destruida por tratamientos físicos y químicos tal como el calor, irradiación (incluyendo rayos y luz ultravioleta), procesos de oxidación, cambios en el pH y diversos compuestos químicos. La velocidad a la que se destruye la infectividad, depende de la cepa del virus, el tiempo de exposición a los agentes, la cantidad de virus expuesto, la naturaleza química del medio de suspensión y la interacción entre tratamientos (Swayne *et al.*, 2004; OIE, 2011).

2.1.8 Epidemiología

2.1.8.1 Distribución e Incidencia

A pesar que la infección por el vENC ha sido reportada en todos los continentes, incluyendo la Antártida, el uso universal de vacunas en aves de corral imposibilita determinar la distribución geográfica real del vENC. Incluso con el monitoreo internacional de la ENC realizado por la FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) y la OIE, los datos pueden no representar la verdadera distribución de la ENC, debido a brotes no reportados o por reportes solo en líneas comerciales, ignorando de esta manera la presencia de brotes en aves de traspatio o en crianza de aldeas (Alexander *et al.*, 2012).

La potencial diseminación del vENC por palomas silvestres y cormoranes continúa siendo preocupante para los productores de aves de corral. Esporádicamente ocurren también brotes en países donde la ENC no es endémica, sin embargo es rutinaria la vacunación contra este virus (Kapczynski *et al.*, 2005). Los casos de presentación de enfermedad no reportados en ciertas áreas confunde acerca de la certeza de qué genotipos están circulando actualmente entre las diferentes especies de aves de todo el mundo (Diel *et al.*, 2012).

Cabe resaltar, que países con mayor población de aves de traspatio tienen mayores problemas en alcanzar el éxito de tales medidas que aquellos países con la mayoría de animales en grandes poblaciones comerciales. Es importante tener en cuenta que algunos países declarados libres de ENC por largos periodos, presentaron monitoreos positivos a infecciones asintomáticas con virus avirulentos, posiblemente diseminados por aves acuáticas y aves silvestres (Miller *et al.*, 2012).

2.1.8.2 Hospederos

El vENC es el que posee rango más amplio de hospederos dentro de los 10 serotipos de Paramixovirus Aviaries (Miller *et al.*, 2010; Briand *et al.*, 2012). Se ha demostrado la infección natural o experimental con el vENC en cerca de 250 especies de aves (Carter *et al.*, 2005) pertenecientes a 27 de los 50 órdenes de aves; que juegan un rol importante en la epidemiología de la enfermedad; sin embargo, el pollo sigue siendo el huésped natural de mayor importancia de la enfermedad (Alexander *et al.*, 2012).

En términos generales las aves silvestres son mucho más resistentes al vENC que los pollos domésticos y si bien se infectan, mayormente no presentan signos clínicos (Kitching, 2004), pero sí seroconvirten; en un estudio realizado en Alemania con 262 muestras de aves silvestres de 26 especies diferentes, se obtuvo 8,4% de aves positivas a la prueba de inhibición de la hemoaglutinación aun cuando todas las aves al momento del muestreo estuvieron aparentemente normales (Ziedler *et al.*, 1993).

Parece razonable concluir que la gran mayoría, sino todas las especies de aves son susceptibles a la infección, pero la observación de signos clínicos dependerá de la cepa del virus y del hospedero (Miller *et al.*, 2012).

2.1.8.3 Transmisión y Diseminación

La transmisión horizontal del vENC ha sido documentada muchas veces. Esta se da por contacto directo entre aves infectadas y aves susceptibles. Las aves infectadas liberan secreciones orofaríngeas y material fecal con alta carga viral (Icochea, 2007). Las aves susceptibles son infectadas por inhalación de estas secreciones o por la ingestión de material fecal. La infección por

inhalación se confirma por el éxito de la aplicación de vacunas vivas contra el vENC utilizando nebulizadores. Asimismo, la aplicación de vacunas vía agua de bebida ilustran la infección oral por ingestión (Mazija *et al.*, 2010).

Casos de transmisión vertical de vENC desde progenitores a su descendencia, son difíciles de comprobar ya que los embriones pueden infectarse a través de grietas en la cáscara de huevo o por la exposición a un ambiente contaminado al momento de eclosionar (Capua *et al.*, 1993).

Los vectores mecánicos de mayor potencial de diseminación del vENC son los humanos y sus equipos. Los humanos se pueden infectar con el vENC en la mucosa conjuntival, y esto podría funcionar como un medio de diseminación, pero el método más probable es la transferencia mecánica de material contaminado principalmente con heces (Miller *et al.*, 2012).

Las aves migratorias y las aves importadas ilegalmente han sido implicadas en la introducción de la enfermedad en ciertas regiones (Panigrahy *et al.*, 1993).

Las cepas de PMVA-1 se pueden encontrar en los huevos. Un embrión infectado con vENC generalmente morirá antes de finalizar su periodo de incubación, los huevos rotos pueden transmitir horizontalmente el virus a otros pollitos en la incubadora. Algunos embriones infectados con bajas dosis de virus podrían sobrevivir (CFSPH, 2011).



Figura 2. Vías de transmisión del virus de la enfermedad de Newcastle. Fuente: CFSPH, 2011.

2.1.9 Signos Clínicos

El tiempo entre la exposición y el desarrollo de los signos clínicos al vENC dependerá de la especie, status inmunitario, edad y salud el ave huésped, así como la virulencia del virus, la cantidad de virus recibido e incluso la ruta de exposición. La enfermedad se caracteriza, por ser de presentación aguda, rápida diseminación y afectar aves de todas las edades (Báez, 1994; Monroy, 2000). La presentación de la enfermedad en aves de corral, es tan virulenta que el ave puede morir sin presentar signos, y en corrales de aves no vacunadas puede presentar una mortalidad de 100%.

Básicamente, la enfermedad se presenta bajo tres formas clínicas: la respiratoria, la digestiva y la nerviosa (King, 1999).

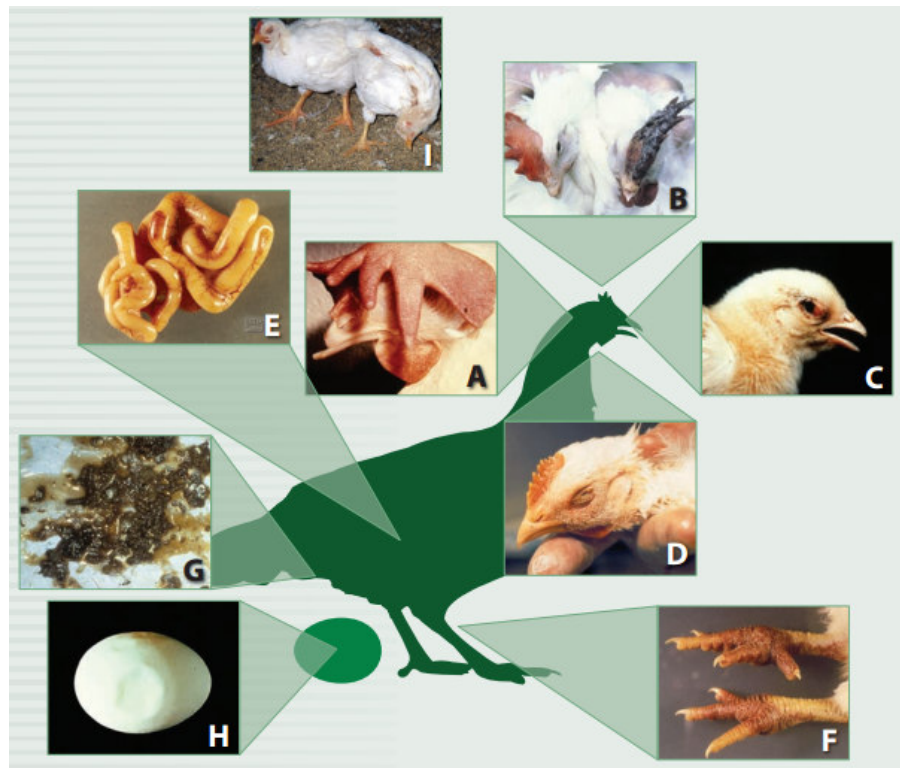


Figura 3. Signos clínicos producidos por el vENC. Fuente: CFSPH, 2011. A: Congestión y edema de la cresta y barba; B: inflamación de los tejidos alrededor de los ojos y cuello; C: estornudos, tos; D: Cianosis de la barba y cresta; E: lesiones hemorrágicas en intestinos; F: edema y hemorragias en patas; G: Diarrea verdosa y acuosa; H: huevos deformes o cáscara blanda; I: signos nerviosos.

2.1.10. Patología

2.1.10.1 Lesiones Macroscópicas

Las lesiones que se presentan dependen de la cepa y el patotipo del virus infectante, a pesar de no existir lesiones patognomónicas asociadas a alguna forma de la enfermedad, las lesiones más severas se ven en aquellos casos de infecciones con virus velogénicos. Independientemente del patotipo que lo ocasione, no se observan lesiones macroscópicas en el sistema nervioso central de aves infectadas con vENC. Las lesiones macroscópicas también pueden estar ausentes. Las lesiones en el tracto intestinal se muestran como hemorragias; frecuentemente se observan en la mucosa del proventrículo, ciegos e intestino grueso y delgado. Estas hemorragias parecen ser el resultado de la necrosis de las paredes intestinal o del tejido linfoide como las tonsilas cecales y las placas de Peyer. Las lesiones en el tracto respiratorio, no siempre están presentes, sin embargo, cuando son observadas consisten predominantemente en inflamación, hemorragia marcada congestión de la mucosa de la tráquea. Lesiones patológicas se observa en otros órganos como las hemorragias en la conjuntiva inferior, necrosis focal del bazo, edema paratraqueal mayormente cercar al ingreso de la tráquea (Alexander *et al.*, 2012).

2.1.10.2 Lesiones Microscópicas

La histopatología en infecciones del vENC es tan variada como los signos clínicos y las lesiones macroscópicas (Cheng *et al.*, 2002; Lam *et al.*, 2011). Las lesiones más comunes encontradas en pollos y pavos son las siguientes:

- a. **Sistema vascular:** Edema, hemorragia y congestión en vasos sanguíneos asociados a diversos órganos.
- b. **Sistema linfoide:** Necrosis y depleción de tonsilas cecales, bazo, timo, glándula de Harder y bursa.

- c. **Sistema nervioso:** Encefalitis no purulenta con degeneración neuronal, focos de células gliales, infiltración perivascular de linfocitos e hipertrofia de células endoteliales en el cerebelo, médula y zona central del cerebro.
- d. **Tracto intestinal:** Hemorragia y necrosis del tejido linfoide de la mucosa.
- e. **Tracto respiratorio:** Pérdida de cilios, congestión, edema y densa infiltración linfocítica y de macrófagos a través de toda la tráquea.

2.1.11 Inmunidad

La inmunidad local mediada por células a nivel del tracto respiratorio se desarrolla más rápidamente que la inmunidad humoral (Fernández, 2005), pudiendo ser detectada tan tempranamente como dos a tres días post infección con cepas vacunales vivas, sin embargo, por sí sola no es protectora contra desafíos con cepas virulentas. Siendo la primera línea de defensa del huésped contra infecciones virales, el sistema de interferón (IFN) induce un estado antiviral que puede inhibir la replicación viral y, por consecuencia, controlar la diseminación del virus (Kapezynki *et al.*, 2005).

Para medir la respuesta humoral después de una vacunación frecuentemente se usa la prueba de HI, los antígenos más importantes del vENC son las glicoproteínas de superficie HN y F (King, 1999; Villegas, 2003). La principal función de la respuesta humoral es la de disminuir la velocidad de diseminación viral a diferentes tejidos dentro del huésped (Fernández, 2005).

La inmunosupresión puede tener efectos negativos sobre la respuesta inmunológica del huésped y puede ocurrir en casos de infección con otros virus como el de Gumboro, Anemia Infecciosa (Alexander *et al.*, 2008) y la presencia de Aflatoxina B1. Si la respuesta inmune se encontrará comprometida, se podrán esperar reacciones postvacunales más severas (Otim *et al.*, 2005).

2.1.12 Diagnóstico

El diagnóstico de la enfermedad en campo es bastante difícil, por lo que se requiere de su confirmación en el laboratorio (Morales, 1995). Esto se debe a que ninguno de los signos o lesiones del vENC pueden ser considerados patognomónicos, además la amplia variación de la enfermedad según la cepa viral, el huésped afectado y otros factores hacen que estos parámetros indiquen solo sospecha de infección de aves con el vENC. De la misma forma, es fundamental distinguir entre aves infectadas con el vENC y aves con presencia de cepas lentogénicas del virus, que se da por el uso casi universal de vacunas vivas. De ahí, la importancia de las pruebas de diagnóstico definitivo que permitirán tomar las decisiones y medidas de control adecuadas y oportunas.

El diagnóstico puede realizarse mediante aislamiento e identificación del virus y por serología, siendo las pruebas más usadas la inhibición de la Hemoaglutinación (HI) y la prueba de inmunoensayo con enzimas asociadas (ELISA) (Aguirre 1990; Alexander, 1997).

2.1.12.1 Aislamiento Viral

El diagnóstico definitivo del vENC se realiza a través del aislamiento y la identificación del virus. El virus puede ser encontrado en pulmón, tráquea, encéfalo, bazo, tracto gastrointestinal y médula ósea, Hisopados traqueales y cloacales son una buena fuente de virus para el aislamiento de este agente infeccioso. El aislamiento viral permite a su vez la caracterización de la cepa infectante (Alexander *et al.*, 2012).

2.1.12.2 Serología

La presencia de anticuerpos específicos al vENC en las aves ofrece poca información sobre la cepa de virus que infecta y por lo tanto tiene limitado valor diagnóstico. No obstante, en poblaciones de aves no vacunadas la demostración de anticuerpos indica que ha sucedido la

infección, lo que unido al cuadro clínico observado posibilita emitir el diagnóstico (Thayer *et al.*, 2008).

Diferentes pruebas serológicas se han utilizado para la detección de anticuerpos al vENC, pero las más empleadas en la actualidad son la prueba de HI y la prueba de ELISA. Los resultados de estas pruebas, por lo general requieren de dos días, a diferencia de los cultivos que pueden tomar de 3 a 5 días hasta varias semanas (Gerlach, 1994).

Los sueros de pollos raramente dan respuestas positivas no específicas en esta prueba y cualquier tratamiento previo del suero será innecesario (OIE, 2004). Existe evidencia que las menores variaciones antigénicas entre diferentes cepas del vENC pueden resultar en títulos diferentes por HI con el mismo antisuero. Esto es particularmente cierto cuando se utiliza la variante de la paloma (PPMV-1) como antígeno (Alexander, 1998).

Sueros de otras especies (incluyendo pavos) pueden ocasionar bajos títulos y aglutinación no específica de glóbulos rojos de pollos, complicando la prueba. Dicha aglutinación puede ser eliminada por adsorción con concentrado de glóbulos rojos de pollos antes de la prueba (OIE, 2004).

Las pruebas de HA y HI no se ven muy afectadas por cambios menores en la metodología, aunque se ha recalcado la naturaleza crítica del periodo de incubación del complejo antígeno/anticuerpo en pruebas de estandarización. Estudios no siempre han reportado buena reproductividad en pruebas de HI entre distintos laboratorios (Alexander, 2001).

Existe una variedad de kits comerciales de ELISA y estos se basan en varias estrategias distintas para la detección de anticuerpos contra el vENC, incluyendo la forma indirecta, sándwich y competitividad o bloqueo utilizando anticuerpos monoclonales (MABs). Al menos uno de estos kits utiliza una subunidad de antígeno. Usualmente estas pruebas han sido evaluadas y validadas por

el productor, y es por esto muy importante que se sigan cuidadosamente las instrucciones específicas para su uso (OIE, 2004).

La mayor ventaja de las pruebas ELISA es que suelen ser semiautomáticas, lo que permite la obtención de resultados rápidamente y de forma económica, especialmente cuando el suero debe ser analizado contra anticuerpos para varios virus. El valor de ELISA para el diagnóstico se ve afectado por la necesidad de modificar y validar la prueba para diferentes especies. Los ELISAs por lo general son muy sensibles y esto podrá restringir su valor en pruebas diagnósticas cuando existen relaciones antigénicas, como es el caso de los paramixovirus aviares. Ambos problemas se pueden solucionar con el uso de ELISA competitivo empleando uno o más MABs, aunque se necesitaría buena evidencia que los MABs reaccionará con todas las cepas del vENC y no con los otros paramixovirus aviares (Alexander, 1998).

Los títulos de HI pueden emplearse para evaluar el estado inmune de un grupo de aves. En grupos vacunados que están siendo controlados serológicamente, es posible identificar respuestas anamnésicas como resultado de una infección de desafío con el virus de campo, pero se debería proceder con gran cautela porque se pueden producir variaciones por otras causas. Por ejemplo, se ha demostrado que las infecciones por el virus APMV-3 de pavos vacunados contra el vENC darán como resultado títulos sustancialmente elevados frente al virus de la ENC (Alexander, 1998).

Cabe mencionar que las pruebas más usadas en serología como es HI y ELISA detectan diferentes tipos de anticuerpos; mientras que ELISA son principalmente Ig G, en la prueba de HI son Ig M, teniendo la prueba de HI una muy buena sensibilidad para respuestas inducidas por cepas de campo y la prueba de ELISA para respuestas inducidas por cepas vacunales (Ramani *et al.*, 2012).

2.1.12.3 Diagnóstico Diferencial

En general, el vENC produce signos clínicos que involucran tanto el tracto respiratorio digestivo y al sistema nervioso, y como resultados, cualquier infección, toxina u otra condición que ocasione dichos signos, debe ser tomada en cuenta que el diagnóstico diferencial (Alexander, 1989).

Dentro de las posibles causas que ocasionen los mencionados signos las principales son:

- a. **Influenza Aviar Altamente Patógena:** la ENC debe diferenciarse de la influenza aviar, pues este virus también hemoaglutina los glóbulos rojos de pollo y causa signos clínicos similares a los observados en la ENC, como los siguientes: plumaje erizado postración y depresión extrema, caída repentina de la producción de huevos, varios huevos con cáscara blanda o sin cáscara, edema y congestión de generalizados de la piel, debajo de los ojos; también signos respiratorios como tos, estornudos, ronquera, signos nerviosos y diarreas hemorrágicas.
- b. **Viruela aviar (forma diftérica o húmeda):** Existen dos formas comunes de viruela aviar, mencionadas como las formas “seca” y “húmeda”. La forma húmeda se caracteriza por la presencia de lesiones similares a costras en la piel, y es improbable que se confunda con IA o EEN. En la forma húmeda, las lesiones ocurren sobre las superficies mucosas, como la conjuntiva del ojo, los conductos nasales, la mucosa oral y faríngea y la mucosa de la tráquea. Desde el punto de vista clínico esta forma es más grave, puede interferir con la alimentación o la respiración y puede producir la muerte debido a la asfixia cuando está afectada la tráquea.
- c. **Coriza infecciosa:** causada por la bacteria *Haemophilus paragallinarum*, que principalmente ataca el sistema respiratorio superior y los conductos nasales. Los síntomas comunes son inflamación de la cara, respiración con dificultad, estornudos, descarga nasal, conjuntivitis y respiración con la boca abierta. La coriza infecciosa puede ser aguda o

crónica. Los casos agudos se propagan rápidamente y la muerte puede ocurrir en el término de horas a días después de la aparición de los primeros síntomas. Los portadores crónicos sirven de reservorios de infección para parvadas de aves de corral.

- d. **Laringotraqueítis infecciosa:** una enfermedad respiratoria aguda causada por un herpesvirus. Principalmente afecta a los pollos pero también puede ocurrir en los pavos y en las aves de caza. El virus puede persistir durante períodos prolongados en aves recuperadas y en el medioambiente. La laringotraqueítis infecciosa puede variar de enfermedad respiratoria leve a enfermedad grave, con una respiración dificultosa que inicia repentinamente, ojos acuosos inflamados, tos, expulsión de sangre de la boca y las fosas nasales, niveles elevados de mortalidad, disminución del consumo de alimentos y disminución de la producción de huevos.
- e. **Micoplasmosis:** *Mycoplasma gallisepticum* y *Mycoplasma synoviae* pueden producir signos respiratorios superiores e inferiores y depresión.
- f. **Bronquitis infecciosa:** otro virus respiratorio que puede causar signos respiratorios, menores niveles de producción de huevos y morbilidad.
- g. **Problemas de manejo:** como la falta de agua o alimentos, y una ventilación deficiente (hipertermia, extrema falta de agua).

La diferenciación preliminar del MPVA-1 con los virus de influenza aviar puede ser determinada por la exanimación en microscopio electrónico, en la cual la tinción con contraste negativo revelará las diferencias morfológicas como por ejemplo la presencia de la nucleocápside característica emergiendo de los AMPV-1 (Alexander *et al.*, 2012).

III.-MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Lugar y tiempo de estudio

El estudio se realizó durante los meses de febrero del 2013 a setiembre del 2013 en el Laboratorio de Patología Aviar de la Facultad de Medicina Veterinaria de la UNMSM en Lima, Perú.

3.2 Muestras

Fueron analizados un total de 196 muestras de suero procedentes de pollos criados experimentalmente desde el primer día hasta los 42 días de edad y que fueron desafiados a los 28 días con una cepa velogénica viscerotrópica del virus de la enfermedad de Newcastle.

Las muestras fueron divididas en dos grupos:

1. Muestras de sueros de aves vacunadas y no desafiadas.
2. Muestras de sueros de aves vacunadas y desafiadas con virus patógeno velogénico viscerotrópicos.

A ambos grupos de sueros se les realizó la prueba de ELISA y la prueba de HI con antígeno de tropismo entérico y antígeno de tropismo respiratorio.

3.3 Materiales de laboratorio

3.3.1 Prueba de INHIBICIÓN DE LA HEMAGLUTINACIÓN (HI):

- a) Antígeno La sota con 8 unidades hemaglutinantes (UHA).
- b) Antígeno Entérico con 8 UHA.
- c) Glóbulos rojos al 0.7%.
- d) Solución Buffer fosfato salina (PBS).
- e) Microplacas con fondo en U.

3.3.2 Prueba de INMUNOENSAYO CON ENZIMAS ASOCIADAS (ELISA):

Kit de ELISA para detección del vENC, del Laboratorio IDEXX conteniendo:

1. Kit NVD para la detección de Anticuerpos frente al Virus de la Enfermedad de Newcastle (Pollo). (IDEXX NDV).
2. Lector de ELISA, modelo ELX 800 Biotec Instrument, Inc.
3. Programa computarizado NVD de ELISA IDEXX - Enfermedad de Newcastle.
4. Pipetas de 1 microlitro.
5. Pipetas multicanal regulables de 10 a 300 microlitros.
6. Puntas desechables para pipetas.
7. Sistema de lavado manual y agua destilada o desionizada.
8. Recipientes para los reactivos.
9. Recipientes para los desinfectantes para desecho.

10. Papel absorbente para el secado de las microplacas.
11. Reloj cronometro.

3.4 Instrumentos y Equipo

- a) Pipetas de alta precisión (20-200 ul, 1-20 ul).
- b) Pipetas de 1 ml y 5 ml.
- c) Pipetas multicanal de 8 a 12 canales.
- d) Tips de 100 ul.
- e) Microdilutor.
- f) Mechero.
- g) Centrífuga.
- h) Frascos de vidrio estériles.
- i) Aguja N° 21x1.5 pulgadas.
- j) Recipiente de lavado.
- k) Lector de ELISA (modelo ELX 800 Biotec Instrument, Inc.)

3.4 Método de evaluación

3.4.1 Colección de Muestras

Las muestras de sangre se obtuvieron por punción de la vena alar, colectándose aproximadamente 2 mL de sangre por ave en jeringas descartables N°21G x 1.5, las muestras fueron trasvasadas a frascos de vidrio estériles sin anticoagulante e individualmente identificadas, manteniéndose los frascos al ambiente por una hora en plano inclinado, para la obtención del suero para su posterior procesamiento por la prueba de HI en el Laboratorio de Patología Aviar de la

Facultad de Medicina Veterinaria de la UNMSM. El suero remanente de la prueba de HI fue congelado para su posterior evaluación por la prueba de ELISA.

3.4.2 Detección de anticuerpos contra el vENC por la prueba de HI. Se utilizó el protocolo descrito por Alexander en 1998.

a. Preparación de solución de glóbulos rojos (G.R.) al 0.7%

1. Usar una aguja y jeringa estéril.
2. Colocar 1mL de anticoagulante (EDTA) en una jeringa de 10 mL.
3. Extraer 5mL de sangre por punción de la vena alar a un pollo sano no menor de 40 días.
4. Cuidadosamente mezclar la sangre con el anticoagulante.
5. Trasvasar la solución a un tubo de centrifuga.
6. Centrifugar durante 5 minutos a 1 200 rpm.
7. Remover y descartar el sobrenadante.
8. Lavar los G.R. adicionando 20 volúmenes de una solución salina fosfatada (PBS) estéril al paquete celular. Mezclar cuidadosamente.
9. Centrifugar durante 5 minutos a 1 200 rpm.
10. Repetir esta acción por lo menos tres veces, hasta que los glóbulos rojos estén completamente limpios.
11. Para preparar 100 mL de solución de G.R.:
12. Colocar 0.7mL de glóbulos rojos lavados y completar hasta 100 ml añadiendo.
13. 99.3 mL de PBS estéril.
14. Mezclar suavemente.

15. Guardar refrigerado hasta su uso por no más de tres días.

b. Titulación del antígeno del virus de la enfermedad de Newcastle:

1. Con la ayuda de una micropipeta multicanal con tips descartable colocar 25 uL de suero fisiológico en cada una de las celdas de una micropipeta con fondo en “U”.
2. Colocar 25 uL de antígeno solo en la primera celda.
3. Con la ayuda del microdilutor de 25 uL mezclar el contenido y pasar 25 uL a la segunda hilera de celdillas, y así sucesivamente hasta llegar a la última celdilla donde se descartan los 25 uL sobrantes. De esta manera se obtienen diluciones seriadas de 1:2, 1:4, 1:8, y así sucesivamente hasta 1:128.
4. Adicionar a cada pozo de la microplaca 35 uL de glóbulos rojos al 0.75%.
5. Incluir un control de glóbulos rojos, adicionando 25 uL de suero fisiológico y 25 uL de glóbulos rojos.
6. Incubar a medioambiente por 30 minutos.
7. Realizar la lectura: El título hemoaglutinante del antígeno es la dilución más alta donde existe una hemoaglutinación completa.

Para detectar el virus de la enfermedad de Newcastle por la prueba de HI se necesitan 8 unidades hemoaglutinantes.

c. Prueba de la inhibición de la hemaglutinación.

Procedimiento de la prueba:

1. Llenar las celdas de una microplaca fondo en “U” con 25 uL de suero fisiológico con la ayuda de una micropipeta.

2. Adicionar 25 uL de las muestras de suero de aves a cada una de las once celdillas de la primera hilera de cada placa dejando una para el control negativo.
3. Con la ayuda del microdilutor de 25 uL mezclar el contenido y pasar 25 uL a la segunda hilera de celdillas, mezclar y volver a pasar a la tercera hilera, prosiguiendo sucesivamente hasta el término de la microplaca, obteniendo diluciones seriadas de 1:2, 1:4, 1:8, y así sucesivamente.
4. Agregar con una micropipeta 25 uL de Antígeno del vENC.
5. Incubar a medio ambiente por 15 minutos.
6. Cubrir toda la placa con 35 uL de glóbulos rojos.
7. Incubar a medioambiente por 30 minutos.
8. Realizar la lectura: el titulo final de anticuerpos será la reciproca de la dilución más alta donde se haya inhibido la hemaglutinación.

Interpretación de resultados de la prueba de HI:

Positivo: Formación de un botón rojo en el fondo de la celdilla, como consecuencia de la sedimentación de los glóbulos rojos no aglutinados, debido a que los anticuerpos del suero reaccionaron con el antígeno inhibiendo la capacidad de este de aglutinar a los glóbulos rojos.

Negativo: Formación de una malla en el fondo de una celda, indicando ausencia de anticuerpos en el suero, aglutinándose los glóbulos rojos a consecuencia del antígeno.

3.4.3 Detección de anticuerpos para el vENC por la prueba de ELISA.

Se usó kits comerciales de ELISA para la detección de anticuerpos contra el virus de la enfermedad de Newcastle de los Laboratorios IDEXX, la prueba se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante.

1. Dejar que los reactivos alcancen 18 a 26°C, luego agítelos suavemente por inversión y con un movimiento circular.
2. Obtenga la placa (o placas) tapizadas con antígeno y anote la posición de las muestras.
3. Vierta 100 *ul* de control negativo no diluido en los pocillos por duplicado.
4. Vierta 100 *ul* de control positivo no diluido en los pocillos por duplicado.
5. Vierta 100 *ul* de muestra diluida en los pocillos correspondientes. Las muestras pueden analizarse por duplicado pero el análisis en un solo pocillo es también aceptable.
6. Incube durante 30 minutos (+/- 2 minutos) a 18°-26°C.
7. Aspire el contenido líquido de todos los pocillos y transfíralo a un recipiente de desperdicios adecuado.
8. Lave cada pocillo de tres a cinco veces con unos 350 *ul* de agua destilada o desionizada. Aspire el contenido completamente.
9. Vierta 100 *ul* de Conjugado a cada pocillo.
10. Incube durante 30 minutos (+/- 2 minutos) a 18°-26°C.
11. Repita los pasos 7 y 8.
12. Vierta 100 *ul* de la Solución de substrato (TMB) en cada pocillo.
13. Incube durante 15 minutos (+/- 1 minuto) a 18°-26°C.
14. Vierta 100 *ul* de solución de frenado en cada pocillo para frenar la reacción.
15. La placa (placas) fue leída por un lector de ELISA (modelo ELX 800 Biotec Instrument, Inc.) utilizándose un filtro de 650 nm.

La cuantificación de los títulos de anticuerpos se determinó por el aumento de color resultante que es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpos anti-NDV presentes en la muestra.

3.5 Análisis de la Datos

Los resultados obtenidos a partir de las pruebas serológicas de ELISA indirecta e inhibición de la hemaglutinación (HI) para las cepas La Sota y Entérica fueron organizados como base de datos en una hoja de cálculo de Excel Microsoft e ingresados posteriormente al programa estadístico Stata 12.0 (Stata Corp.) para los análisis correspondientes. Los niveles de seroconversión medidos en cada una de las pruebas diagnósticas antes mencionadas fueron clasificadas de la siguiente manera: 1). Negativo; 2). Bajo, 3). Medio y 4). Alto. Este criterio de clasificación toma en consideración los siguientes puntos de corte diagnóstico para los ensayos de Inhibición de la Hemaglutinación y ELISA:

Cuadro 1. Clasificación del nivel de seroconversión para los ensayos de Inhibición de la hemaglutinación (HI) y ELISA

Nivel de seroconversión	Inhibición de la Hemaglutinación	ELISA
Negativo	0	0 a 490
Bajo	1 /2 a 1/16	500 a 2900
Medio	1/32 a 1/64	3000 a 4900
Alto	1/128 a más	5000 a más

Fuente: Laboratorio de Patología Aviar (FMV – UNMSM)

A partir de esta clasificación se evaluó el nivel de concordancia de los resultados entre cada una de las pruebas diagnósticas a los días 26 (pre-desafío) y 42 (post-desafío) mediante el valor de Índice de Kappa (K), el cual queda definido mediante la siguiente expresión:

$$k = \frac{Po - Pe}{1 - Pe}$$

Donde

- Po denota la probabilidad de valores concordantes observados
- Pe denota la probabilidad de valores concordantes aleatorios

Los resultados del análisis de Kappa fueron clasificados tal como se indica en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Valores de clasificación referenciales para los resultados del análisis de concordancia de Kappa

Índice de Kappa	Concordancia
0	Nula
0.01 – 0.20	Muy pobre
0.21 – 0.40	Pobre
0.41 – 0.60	Moderada
0.61 – 0.80	Completa
0.81 – 1.00	Casi Perfecta

Fuente: Steel *et al.*, 1996

Asimismo, los resultados de concordancia fueron presentados con sus respectivos intervalos de confianza al 95%. Los resultados finales fueron organizados en tablas de contingencia y en gráficas Boxplot respectivamente.

IV.- RESULTADOS

4.1 Concordancia entre los resultados de ELISA e Inhibición de la Hemaglutinación (HI- cepa respiratoria La Sota):

El análisis de concordancia entre los resultados serológicos de ELISA y de HI – cepa respiratoria La Sota a los días 26 y 42 es presentado en los cuadros 3 y 4 respectivamente. En relación al análisis de las muestras de suero al día 26, momento en el cual las aves aún no se encontraban desafiadas con la cepa patógena velogénica viscerotrópica del virus de la ENC, los resultados indicaron un nivel de concurrencia observada de 30.61%; en comparación al porcentaje de concurrencia aleatoria de 19.58%. Los resultados demostraron un valor de índice de Kappa de 0.14, estadísticamente significativo ($p<0.05$), con intervalos de confianza al 95% con valores desde 0.06 a 0.22 respectivamente. Considerando al ELISA como la prueba referencial, los resultados de co-positividad más altos se observaron para un nivel de detección alto (84% de co-positividad) comparado con los valores de co-positividad para niveles bajo y medio (29% y 7% respectivamente). El valor de co-negatividad resultó 25%.

Cuadro 3. Distribución de los resultados de serología mediante ELISA e Inhibición de la hemaglutinación (HI) – cepa La Sota, a partir de muestras de suero de aves al día 26 (n=98)

Resultados de HI Cepa La Sota	Resultados de ELISA				
	Negativo	Bajo	Medio	Alto	TOTAL
Negativo	16	0	0	0	16
Bajo	33	2	0	1	36
Medio	9	0	1	1	11
Alto	5	5	14	11	35
TOTAL	63	7	15	13	98

Kappa Índice: 0.14 (IC 95%: 0.06 – 0.22)

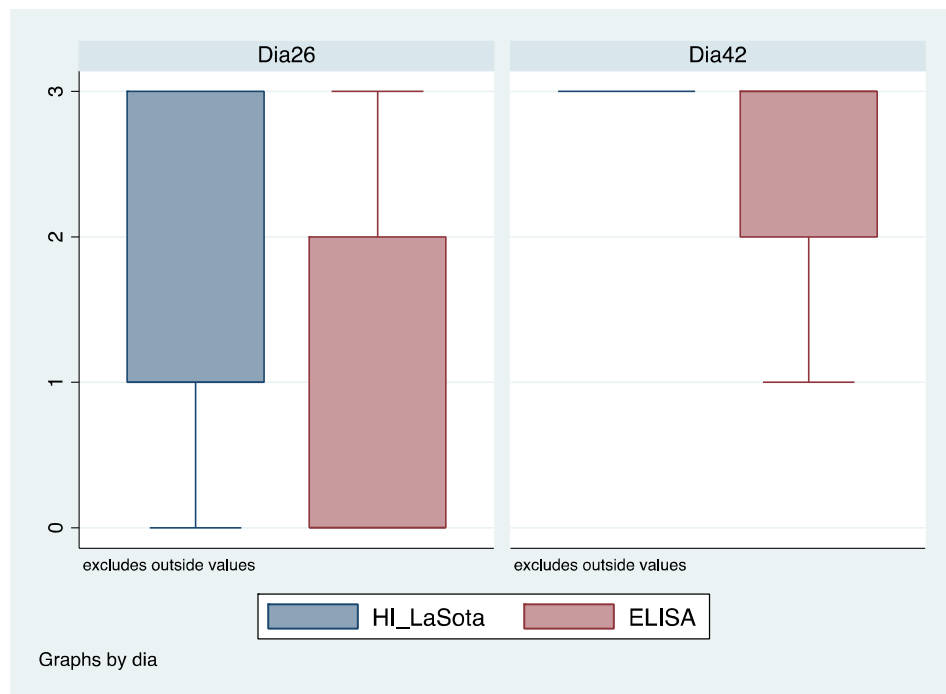
En relación al cuadro 4, los resultados serológicos al día 42 (post-desafío con cepas de virus patógeno de la ENC) indicaron un nivel de concurrencia observada de 67.35%, mientras que la concurrencia aleatoria fue de 62.46%. No se detectaron muestras de suero negativas mediante el análisis de HI. El análisis estadístico reportó un índice de Kappa de 0.13 ($p < 0.05$), con intervalos de confianza al 95% de 0.04 a 0.25. De forma similar, asumiendo al ELISA como la prueba referencial, el valor más alto de co-positividad se observó para un nivel de seropositividad alto de 92.9%, mientras que para los niveles medio y bajo resultaron cero.

Cuadro 4. Distribución de los resultados de serología mediante ELISA e Inhibición de la hemaglutinación (HI) – cepa respiratoria La Sota, a partir de muestras de suero de aves al día 42 (n=98)

Resultados de HI Cepa La Sota	Resultados de ELISA				
	Negativo	Bajo	Medio	Alto	TOTAL
Negativo	0	0	0	0	0
Bajo	2	0	0	0	2
Medio	4	4	0	5	13
Alto	1	10	6	66	83
TOTAL	7	14	6	71	98

Índice Kappa: 0.13 (IC95%: 0.04 – 0.25)

La Gráfica 1 indica los valores de mediana y percentiles obtenidos para los valores de serología a los días 26 (pre-desafío) y 42 (post-desafío). Como se puede apreciar, al día 26 los valores de percentil así como la mediana fueron estadísticamente dispersos entre los resultados de HI la Sota y ELISA. Por otro lado, al día 42, si bien existen variaciones interpercentílicas para los resultados de ELISA, los valores de mediana en ambos ensayos se encontraron para un nivel de detección alto (“3”).



Gráfica 1. Representación gráfica mediante Boxplots (diagrama en cajas) para los valores de mediana y percentiles a partir de los niveles de seroconversión obtenidos mediante ELISA e Inhibición de la Hemaglutinación – cepa la Sota: 0”negativo” 1”Bajo” 2”Medio” 3”Alto”(formato de gráfica Stata 12.0)

4.2 Concordancia entre los resultados de ELISA e Inhibición de la Hemaglutinación – cepa Entérica

En relación a la concordancia entre los resultados de ELISA e HI –antígeno de tropismo Entérico al día 26 (cuadro 4), la concurrencia observada resultó 31.63% de las muestras analizadas, mientras que el valor de concurrencia aleatoria resultó 22.32%. El análisis estadístico reportó un valor de índice de Kappa de 0.12 ($p<0.05$), cuyos rangos mediante intervalos de confianza al 95% fluctuaron entre 0.03 y 0.21 respectivamente. Al asumir al ELISA como la prueba referencial, los valores más altos de co-positividad se observaron para un nivel alto de seroconversión de 84.62%; mientras que el nivel de co-negatividad fue de 28.57% respectivamente.

Cuadro 5. Distribución de los resultados de serología mediante ELISA e Inhibición de la Hemaglutinación (HI) – cepa Entérica, a partir de muestras de suero de aves al día 26 (n=98)

Resultados de HI Cepa Entérica	Resultados de ELISA				TOTAL
	Negativo	Bajo	Medio	Alto	
Negativo	18	1	0	1	20
Bajo	26	1	0	0	27
Medio	13	1	1	1	16
Alto	6	4	14	11	35
TOTAL	63	7	15	13	98

Índice de Kappa: 0.12; IC 95%: 0.03 – 0.21

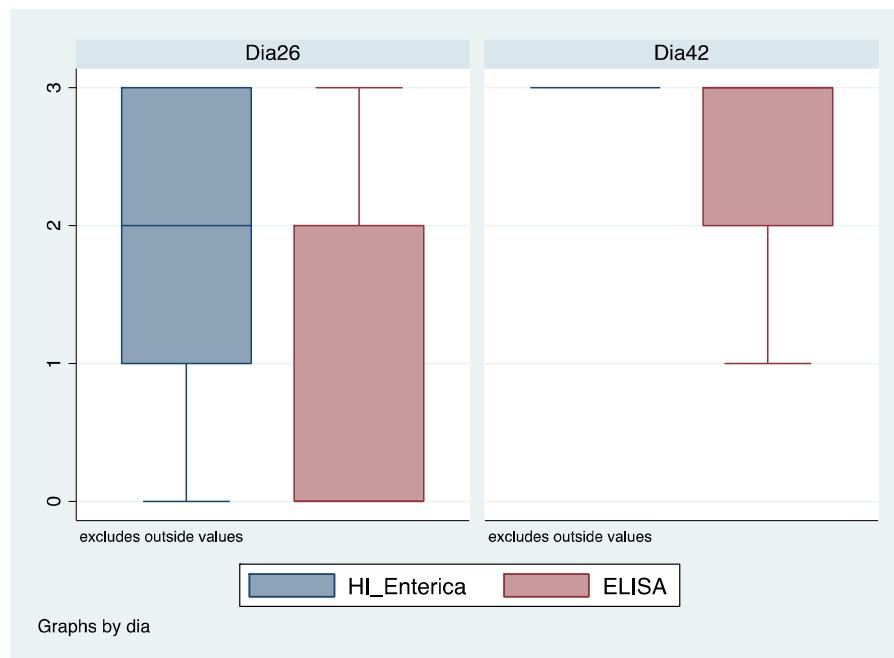
En relación a los resultados de concordancia al día 42 (post-desafío), el análisis estadístico reportó un valor de índice de Kappa de 0.17 (IC 95%: 0.04 – 0.30). Como podemos apreciar en el cuadro 6, los resultados de concurrencia observada representaron el 68.37% de los datos, superiores a los valores de concurrencia aleatoria de 62.88%. Los porcentajes más altos de co-positividad asumiendo al ELISA como la prueba referencial, se encontraron para el nivel de detección alto (94.37%), mientras que no se observaron valores de co-positividad para los otros niveles de seroconversión.

Cuadro 6. Distribución de los resultados de serología mediante ELISA e Inhibición de la Hemaglutinación (HI) – cepa Entérica, a partir de muestras de suero de aves al día 42 (n=98)

Resultados de HI Cepa Enterica	Resultados de ELISA				
	Negativo	Bajo	Medio	Alto	TOTAL
Bajo	2	0	0	0	7
Medio	4	4	0	4	8
Alto	1	10	6	67	83
TOTAL	7	14	6	71	98

Índice de Kappa: 0.17; IC 95%: 0.04 – 0.30)

La gráfica 2, representa los valores de percentiles y mediana para la clasificación de resultados de serología mediante ELISA y HI – cepa Entérica. Como podemos apreciar, al día 26 (pre-desafío) los valores de mediana para los resultados de HI-Entérica fueron para un nivel de detección Medio, mientras que para los resultados de ELISA fueron los resultados negativos. Por otro lado, al día 42 (post-desafío) la mayoría de resultados de seroconversión presentaron una mediana correspondiente al nivel de detección alto; de forma similar para los resultados de ELISA al día 42 la mediana de la interpretación de seroconversión correspondió a un nivel alto, aunque con mayor variabilidad.



Gráfica 2. Representación gráfica mediante Boxplots (diagrama en cajas) para los valores de mediana y percentiles a partir de los niveles de seroconversión obtenidos mediante ELISA e Inhibición de la Hemaglutinación (HI) – cepa Entérica: 0”Negativo” 1”Bajo” 2”Medio” 3”Alto” (formato de gráfica Stata 12.0)

4.3 Concordancia entre los resultados de Inhibición de la Hemaglutinación (HI) – cepa respiratoria La Sota e Inhibición de la Hemaglutinación (HI) – cepa tropismo Entérica

En relación a los resultados de concordancia entre los ensayos de HI – cepa Entérica y los resultados de HI – cepa La Sota al día 26 (Ver cuadro 7), el análisis indicó un nivel de concordancia de 0.62, con intervalos de confianza al 95% de 0.50 a 0.74 respectivamente. La concurrencia observada representó el 72.45% de las muestras analizadas con ambos ensayos; resultando superiores a los valores de concurrencia aleatoria de 28.04%. Los resultados de co-positividad más altos al día 26 entre los resultados de HI-Entérica y HI-La Sota se encontraron en los niveles de alta seroconversión (91.43%) y baja seroconversión (77.78%), mientras que la co-negatividad fue de 60%.

Cuadro 7. Distribución de los resultados de serología mediante Inhibición de la Hemaglutinación (HI) – cepa La Sota e Inhibición de la Hemaglutinación (HI) – cepa Entérica, a partir de muestras de suero de aves al día 26 (n=98)

Resultados de HI Cepa La Sota	Resultados de HI – Cepa Entérica				
	Negativo	Bajo	Medio	Alto	TOTAL
Negativo	12	4	0	0	16
Bajo	8	21	7	0	36
Medio	0	2	6	3	11
Alto	0	0	3	32	35
TOTAL	20	27	16	35	98

Índice Kappa: 0.62; IC 95%: 0.50 – 0.74

El cuadro 8 describe los resultados de concordancia al día 42 (post-desafío). Como se indica, no se observaron valores de seroconversión negativa en ambos ensayos de Inhibición de Hemaglutinación. El análisis reportó un índice de concordancia de Kappa de 0.55 ($p<0.05$) (IC 95%: 0.40 – 0.70). La concurrencia observada entre ambos ensayos representó un 87.76%, superior a la concurrencia aleatoria de 72.96%. La co-positividad más alta se encontró para un nivel de seroconversión alta (95.18%).

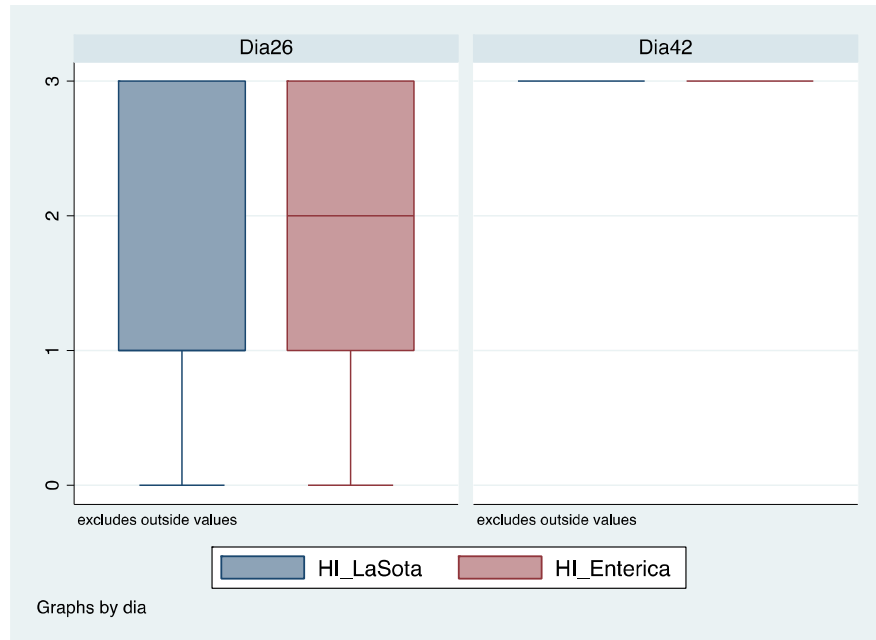
Cuadro 8. Distribución de los resultados de serología mediante Inhibición de la Hemaglutinación (HI) – cepa La Sota e Inhibición de la Hemaglutinación (HI) – cepa Entérica, a partir de muestras de suero de aves al día 42 (n=98)

Resultados de HI – Cepa La Sota	Resultados de HI – cepa Enterica			
	Bajo	Medio	Alto	TOTAL
Bajo	2	0	0	2
Medio	4	5	4	13
Alto	1	3	79	83
TOTAL	7	8	83	98

Índice de kappa: 0.55; (IC95%: 0.40 – 0.70)

La gráfica 3 indica los valores de mediana y percentiles para los niveles de seroconversión de HI-Entérica y HI – La Sota. Al día 26 (pre – desafío) el valor de mediana para los resultados de HI-Entérica se encontró para un nivel de seroconversión medio, mientras que para HI – La Sota fue

para un nivel de seroconversión bajo. Por otro lado, al día 42 (post – desafío), la mediana (percentil 50%) para ambos ensayos serológicos correspondieron a un nivel de seroconversión alto.



Gráfica 3. Representación gráfica mediante Boxplots (gráfica en cajas) para los valores de mediana y percentiles a partir de los niveles de seroconversión obtenidos mediante HI – cepa La Sota y HI – cepa Entérica (Formato de gráfica Stata 12.0).

V.- DISCUSION

Las aves que son expuestas a patógenos desarrollan anticuerpos circulantes que persisten por varias semanas después que el antígeno ha sido procesado, la detección de estos anticuerpos es mucho más conveniente que la detección de la inmunidad celular, habiendo sido desarrolladas varias pruebas serológicas para cuantificar anticuerpos como es el caso de las pruebas de inhibición de la hemoaglutinación y ELISA, esta última es la más común prueba serológica usada bajo condiciones comerciales, la tecnología automatizada de esta prueba permite procesar un gran número de muestras de suero, la transmisión de datos a la computadora facilita el perfil de respuesta serológica del lote y proporciona información útil sobre la exposición ambiental a patógenos y sobre la respuesta a la vacunación (Sharma, 2012). Existen muchos métodos para detectar y cuantificar anticuerpos contra el virus de la ENC, sin embargo las pruebas de HI y ELISA son las más comúnmente usadas, y aun cuando la prueba de HI detecta anticuerpos contra las proteínas del gen de la HN y la prueba de ELISA detecta anticuerpos dirigidos contra todas las proteínas virales, se ha señalado que existe una correlación entre ambas pruebas (Suarez, 2012).

El monitoreo serológico establece una línea base de títulos de anticuerpos que son el resultado de la vacunación o exposición de campo, es una herramienta de gran importancia para la implementación de las estrategias de control dirigido a las enfermedades que afectan a la industria avícola, como por ejemplo la Enfermedad de Newcastle. La detección específica de anticuerpos contra el virus de la ENC es un indicador potencial de infección, por lo cual contribuye de manera significativa con la epidemiología de la enfermedad (Alexander *et al.*, 2008).

De manera general, los resultados serológicos expresados mediante títulos de anticuerpos en HI o títulos derivados del ELISA correlacionan mejor a nivel de lote de aves que a nivel individual (OIE, 2012), y en eso radica su importancia para el monitoreo epidemiológico de la enfermedad.

Sin embargo, debemos considerar la interpretación de los resultados de serología ya sea por ELISA o por HI tomando en consideración los diferentes programas de vacunación en aves, ya que ello puede influir en el patrón de expresión de la respuesta inmune observado mediante la serología.

Es por ello que el presente estudio tuvo por objetivo evaluar el patrón de interpretación de resultados serológicos mediante HI y ELISA en aves vacunadas y posteriormente desafiadas con cepas patógenas del virus de la enfermedad de Newcastle. Los resultados obtenidos a partir de estas pruebas fueron organizados como base de datos en una hoja de cálculo de Excel Microsoft e ingresados posteriormente al programa estadístico Stata 12.0 (Stata Corp.) para los análisis correspondientes. Los niveles de seroconversión medidos en cada una de las pruebas diagnósticas antes mencionadas fueron clasificados como negativo, bajo, medio y alto.

En relación a la concordancia obtenida entre los niveles de seroconversión hallados mediante ELISA y HI para la cepa La Sota, al día 26 (pre-desafío) el análisis de Kappa reportó un índice de concordancia de 0.14, el cual es considerado muy pobre de acuerdo a nuestro criterio de clasificación, y a lo señalado en la hipótesis del estudio. En relación al ELISA existe una mayor proporción de resultados con serología negativa, mientras que los valores para HI resultaron más

variables. Posibles explicaciones para estos resultados estarían relacionados a un proceso de respuesta serológica post-vacunal. La vacunación de las aves fue realizada mediante el uso de la vacuna VG/GA, la cual contiene una cepa apatógena de tropismo entérico. Si bien se realizó el ensayo de HI con el uso de cepa La Sota (lentogénica de tropismo respiratorio), los resultados indicarían que a pesar de ello las aves pueden seroconvertir independientemente. Por otro lado, en relación al día 42 (post-desafío viral), los valores de concordancia mediante el análisis de Kappa demostraron un índice de 0.13, incluso menor al observado al día 26.

Los resultados de co-positividad más altos se encontraron para niveles de seroconversión altos, en comparación a niveles de seroconversión bajos y medios, lo que demuestra una reacción característica luego del post-desafío. Incluso al día 42, los resultados de HI no detectaron seronegativos, lo que corrobora esta información; no obstante si se pudieron observar algunos seronegativos mediante ELISA. La presencia de aglutininas inespecíficas podría alterar los resultados en el ensayo de HI; no obstante a diferencia de otras especies, las muestras de sangre de pollo se caracterizan por ser altamente específicas por lo que no necesitan tratamiento previo de las muestras de suero antes de su procesamiento.

Los resultados generales de concordancia entre los niveles de seropositividad mediante ELISA e HI en nuestro estudio han resultado inferiores en comparaciones con resultados de concordancia hallados por otros investigadores que han reportado valores de concordancia entre HI y ELISA superiores a 0.80 (Charan *et al.*, 1981; Brown *et al.*, 1989; Moro *et al.*, 2000). Estas diferencias probablemente se deban a que en estos estudios consideraron los resultados tanto de HI como ELISA como valores positivos o negativos, sin indicar rangos de positividad dentro de los valores positivos. Para nuestro estudio, durante la fase post-desafío (día 42) resulta más importante caracterizar la concordancia entre niveles de seroconversión para ambas pruebas que resultados negativos y positivos. Esta interpretación a partir de niveles de seroconversión nos permite una

posible caracterización de la respuesta post-desafío en aves vacunadas con diferentes cepas de Newcastle.

Es de esperar que los valores de concordancia entre los niveles de seropositividad de HI y ELISA fueran débiles, debido a que el ensayo de ELISA resulta más sensible para la detección de inmunidad contra cepas de desafío en comparación a HI. Posiblemente los valores de discordancia entre los resultados de ELISA e HI en nuestro estudio están asociados al isotipo de inmunoglobulinas detectadas en ambas pruebas serológicas (Ramani *et al.*, 2012). Mientras que la HI permite una mayor detección de anticuerpos tipo IgM, los ensayos convencionales de ELISA permiten una mayor detección de IgG. Por lo tanto, durante una fase de maduración de la respuesta inmune con cambio de perfil de IgM a IgG existirían niveles de discordancia entre ambas pruebas (Ramani *et al.*, 2012).

En relación a los resultados de concordancia entre los ensayos serológicos de ELISA y HI – cepa Enterica, los índices de kappa al día 26 y 42 resultaron relativamente bajos ($Kappa < 0.20$) lo que demuestra resultados similares a los observados para la comparación entre ELISA y HI – cepa La Sota. De forma similar, al día 42 el porcentaje de co-positividad más alto se encontró para un nivel de seroconversión alto, lo que indica una clara respuesta post-desafío en aves vacunadas previamente, aunque este patrón puede verse influenciado por el esquema de vacunación y el número de vacunaciones.

Estos resultados difieren de varios estudios de concordancia realizados anteriormente, aunque para estos estudios consideraban como criterio diagnóstico resultados positivo o negativo. Al día 42, del ensayo la prueba de Inhibición de la hemaglutinación no detectó sueros negativos, mientras que ELISA si lo hizo. Esto podría explicarse por las diferencias en isotipos de anticuerpos que se detectan en ambas pruebas, ELISA detecta mayormente IgG y HI detecta más IgM, estas últimas se producen más en fases iniciales de infección, en este caso por el reto de campo.

Finalmente los resultados de concordancia para las pruebas de HI – cepa La Sota e HI – cepa Entérica demostraron un nivel de concordancia durante los días 26 y 42 de 0.62 y 0.55 respectivamente, lo cuales son clasificados como moderados. Estos resultados nos permiten caracterizar el nivel de seroconversión dependiendo del tipo de cepa utilizada durante la vacunación. Estos resultados permitirán más adelante poder definir el patrón de respuesta antes diferentes desafíos y diferentes programas de vacunación a nivel de galpones en el país, para un óptimo monitoreo epidemiológico de la enfermedad de Newcastle.

VI- CONCLUSIÓN

La concordancia en la detección de anticuerpos entre las pruebas de HI (antígeno de tropismo entérico y tropismo respiratorio) y ELISA evaluados por la prueba estadística de Índice de Kappa, para antes del desafío y post desafío se clasifico en un rango de 0,12-0,17 lo cual nos indica una concordancia muy pobre.

La concordancia en la detección de anticuerpos por la prueba de HI entre los antígenos de tropismo entérico y tropismo respiratorio, evaluados con la prueba estadística de Índice de Kappa antes del desafío y post desafío se clasifico en concordancia moderada con un índice que varía entre 0,55 – 0,62.

VII.- LITERATURA CITADA

- Abolnik C, Ilorner RF, Bisschop SPR, Parker ME, Romito M, Viljoen GJ. 2004. A phylogenetic study of South African Newcastle disease virus strains isolated between 1990 and 2002 suggest epidemiological origins in the Far East. Arch. Virol. 49:603-619.
- Absalon AE, Mariano MA, Vasquez MA, Morales AG, Cortes VD, Ortega GR, Lucio DE. 2012. Complete genome sequence of a velogenic Newcastle disease virus isolated in Mexico. Virus Genes. 45: 304-310.
- Aguirre A. 1990. Serologic survey for and selected disease agents in wild animals and birds from Mexico. Proceeding American Association of Zoo Veterinarians. 12-14 p.
- Ahmed KA, Saxena VK, Ara A, Singh KB, Sundaresan M, Saxena M, Rasool TJ. 2007. Immune response to Newcastle disease virus in chickens divergently selected for cutaneous hypersensitivity. Int J Immunogenet. 34:445-455.
- Alba M, Icochea E. 1999. Protección vacunal viva-oleosa en pollos broilers contra una cepa viscerotrópica velogénica del virus de la Enfermedad de Newcastle. En: XVI Congreso Latinoamericano de Avicultura, Lima-Perú: APA, 1999. 270 p.

- Aldous EW, Manvell RJ, Cox WJ, Ceeraz V, Harwood DG, Shell W, Alexander DJ, Brown IH. 2007. Outbreak of Newcastle disease in pheasants (*Phasianus colchicus*) in south-east England in July 2005. Vet Rec. 160: 482-4.
- Alexander DJ, Russell PH, Collins MS. 1984. Paramyxovirus type 1 infections in racing pigeons. Characterization of isolated viruses. Vet. Rec., 114: 444-446.
- Alexander D. 1989. Newcastle Disease. In: A Laboratory Manual for the isolation and Identification of Avian Pathogens; 3^o ed. AAAP Hunt Publishing Company. 114-120 p.
- Alexander DJ, Manvell RJ, Lowings JP, Frost KM, Collins MS, Russell PH, Smith JE. 1997. Antigenic diversity and similarities detected in avian paramyxovirus type 1 (Newcastle disease virus) isolates using monoclonal antibodies. Avian Pathology 26: 399-418.
- Alexander D. 1998. Newcastle disease and other avian paramixoviruses, En: Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens; 4th ed. AAAP Hunt Publishing Company. 156-162 p.
- Alexander DJ. 2001. Newcastle Disease-The Gordon Memorial Lecture. Brit Poult Sci 42: 5-22.
- Alexander DJ, Manvell RJ, Banks, Parson G. 2006. Newcastle Disease virus (strain herts 33/56) in tissues and organs of chickens infected experimentally. Avian Pathol. 35:99-101.
- Alexander DJ, Senne DA. 2008. Newcastle Disease. Other Avian Paramyxoviruses and Pneumovirus Infections. In a Laboratory Manual for the Isolation, Identification and Characterization of Avian Pathogens, Dufour-Zavala L. (Editor in Chief) Swayne DE, Glisson JR, Jackwood MW, Pearson JE, Reed WM, Woolcock PR, 4th ed, American Association of Avian Pathologists, Athens GA, 135-141.
- Alexander DJ, Senne DA. 2012. Newcastle Disease of Poultry, 12th eds. Saif YM, Fadly AM, Glisson JR, McDougald LR, Nolan LK, Swayne DE. Iowa. USA. Blackwell-Publishing 75 p.

- Antillon A. 2005. Enfermedad de Newcastle. En: XVII curso Avimex de Salud y Productividad. Enfermedades Virales de Alto Impacto en la Avicultura. 29 de Julio. México DF. 27-43 p.
- Báez J. 1994. Enfermedad de Newcastle. En: Patología de las aves. Cap. 2. I ed. Ed. Trillas-México. 14-18 p.
- Barbezange C, Jestin V. 2003. Monitoring of pigeon paramyxovirus type-1 in organs of pigeons naturally infected with Salmonella typhimurium. Avian Pathol., 32(3):277-283.
- Briand FX, Henry A, Massinand P, Jestin V. 2012. Complete genoma sequence of a novel avian paramixovirus. J Virol. 86(14): 7710.
- Brown J, Resurreccion RS, Dickson TG. 1989. The Relationship between the Hemagglutination-Inhibition Test and the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Antibody to Newcastle Disease. Avian Diseases, Vol. 34, 585-587 p.
- Brown I, Alexander D. 2003. Newcastle disease. En: II Seminario Internacional Influenza Aviar y Enfermedad de Newcastle “Estandarización de Criterios Sanitarios para el Comercio” ALA-OIE. 13 – 15 de agosto. Lima-Perú.
- Cantin C, Holguera J, Ferreira L, Villar E, Munoz BI. 2007. Newcastle disease virus may enter cells by caveolae-mediated endocytosis. J Gen Virol. 88: 559-569.
- Carter, GR; Wise, DJ; Flores, EF. 2005. Paramixoviridae. En: A Concise Review of Veterinary Virology. International Veterinary Information Services, Ithaca, New York (www.ivis.org) Document N° A3423.1105.
- Capua I, Scacchia M, Toscani T, Caporale V. 1993. Unexpected isolation of virulent Newcastle disease virus from commercial embryonated fowls eggs. J. Vet Med B: 40:609-612.
- [CEVA] Servicio Técnico de Ceva. 2013. Nuevas tecnologías en la prevención de la enfermedad de Newcastle en pollos de engorde. [Internet], [25 junio 2014]. Disponible en: <http://www.actualidadavipecuaria.com/ceva/articulos/nuevas-tecnologias-en-la-prevencion-de-la-enfermedad-de-newcastle-en-pollos-de-engorde.html>

- [CFSPH] Center for Food Security and Public Health. 2011. Influenza Aviar y Enfermedad Exótica de Newcastle. [Internet], [13 setiembre 2014]. Disponible en: http://www.cfsph.iastate.edu/pdf-library/Acreditacion-Veterinaria/NVAP-Mod-18-AI-END_Jun2011.pdf
- Chang P. 1998. Detección de la Prevalencia de Anticuerpos contra el virus de la Enfermedad en aves silvestres passeriformes y columbiformes en la provincial de Chancay. para optar por el Tesis Médico Veterinario. Lima. Univ. Nac. Mayor de San Marcos.
- Charan S, Rain A, Mahajan VM. 1981. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay and haemagglutination inhibition test for the detection of Newcastle disease virus antibodies in human sera. J Clin Pathol 1981;34:90-92.
- Chen JP, Wang CH. 2002 Clinical epidemiológica and experimental evidence for the transmission of Newcastle disease virus through eggs. Avian Dis 46:46-465.
- Czegledi A, Kovacs G, Lomniczi B. 2005. Phylodinamics of Newcastle disease virus genotypes. En: 14th World Veterinary Poultry Congress. 22-26 August. Istambul-Turkey. 365 p.
- Diel DG, Miller PJ, Wolf PC, Mickieu RM, Musante AR, Emanuelli DC, Shively KJ, Pedersen K, Afonso CL. 2012. Characterization of Newcastle disease viruses isolated from cormorant and gull species in the United State in 2010. Avian Dis. 56: 128-133.
- Doyle TM. 1927. A hitherto unrecorded disease of fowls due to a filter-passing virus. Journal of Comparative Pathology and Therapeutics 40:144-169.
- Estudillo J. 2000. Algunas consideraciones sobre la enfermedad de Newcastle. En: "Enfermedades Emergentes: Enfermedad de Newcastle". Cap 6. Productores avipecuarios. México D.F.
- [FAO] Food and Agriculture Organization of the United Nations 2004. A technology review: Newcastle disease with special emphasis on its effects on village chickens. FAO, 2004.

- Fehervari T, Monroy L. 2000. Estrategias y control de la Enfermedad de Newcastle en otros países. En: Curso “Enfermedades Emergentes: Newcastle”. México D.F. Julio 14. 12-16 p.
- Fernández RJ. 2005. La enfermedad de Newcastle. Situación actual; medidas de control y prevención. IX Congreso Nacional de Avicultura. Venezuela.
- Flamer K. 1999. Zoonoses Acquired from birds. In: Fowler ME, Miller RE, eds. Zoo and Wild Animal Medicine: current therapy. 4th ed. W.B. Saunders Company. 152-154 p.
- Ferrer R. 2005. Prevalencia de anticuerpos al virus de la enfermedad de Newcastle en aves domésticas *Gallus gallus* del departamento de Lima en el año 2001. Estudio caso control. Tesis para optar por el título de Médico Veterinario, Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Francis DB. 1973. Newcastle and psittacines, 1970-71. Poult. Dig. 32:16-19.
- Gerlach H. 1994. Disease etiologies: Viruses. En: Avian Medicine: Principles and applications. Section five. B.W. Ritchie; G. J. Harrison; L. R. Harrison ed. Florida, Wingers Publishing Inc. 920-929 p.
- Icochea D. 2007. Relación entre aves silvestres y la enfermedad de Newcastle en el Perú. Tesis de Magíster. Lima: Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 71 p.
- [ICTV] International Committee of Taxonomi on Viruses. 2012. Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press, Waltham, MA.
- Ito T, Kawaoka Y, Kameda C, Yasuda J, Kida H, Otsuki K.1999. Differences in receptor specificity between Newcastle disease viruses originating from chickens and wáter-fowl. J Vet Med Sci. 61: 951-953.
- Jordan FT. 1990. Paramixoviridae (Newcastle disease and others). En: poultry diseases. 121-136. 3° ed. Bailliere Tindal. Londres.

- Kapczynski DR, King DJ. 2005. Protection of chickens against overt clinical disease and determination of viral shedding following vaccination with commercially available Newcastle disease virus vaccines upon challenge with highly virulent virus from the California 2002 exotic Newcastle disease outbreak. *Vaccine*. 23: 3424-3433.
- King, D. 1999. Enfermedad de Newcastle en: XVI Congreso Latinoamericano de Avicultura por la Alimentación del Futuro. APA-ALA del 21-24 de septiembre. Lima- Perú. 56-61 p.
- King, D. 2002. Enfermedad de Newcastle: situación mundial y control. En: memorias del X Seminario Internacional de Patología y Producción Aviar, del 27 de mayo al 31 de mayo. Georgia- USA.
- King DJ. 2004. Newcastle Disease and Its Influence on the International Poultry Market. Seminario Internacional de Patología Aviar. Univ. De Valdivia, Chile, Sept. 2004.
- Kirkland PD. 2000. Virulent Newcastle disease virus in Australia: in through the 'back door'. *Austral. Vet. J.*, 78:331-333.
- Kitching R. 2004. Management of exotic diseases outbreaks: Learning by example. 23 Congreso Mundial de Buiatría. 11-16 Julio 2004. Quebec-Cánada.
- Kraneveld FC. 1926. A poultry disease in the Dutch East Indies. *Ned Indisch BI Diergeekd* 38: 448-450 p.
- Lam HY, Yeap SK, Rasoli M, Omar AR, Yusoff K, Suraini AA, Banu N. 2011. Safety and clinical usage of Newcastle disease virus in cancer therapy. *J Biomed Biotechnol*. 2011:718710.
- Lamb R, Parks GD. 2007. Paramixoviridae: The viruses and their replication. In *Fields Virology*, Vol. 1. B. Fields B, Knipe DM, Howley PM, eds. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia. 1449-1496.
- Li J, Melanson VR, Mirza AM, Iorio RM. 2005. Decreased dependence on receptor recognition for the fusion promotion activity of L289A-mutated Newcastle disease virus fusion protein correlates with a monoclonal antibody detected conformational change. *J. of Virology*, 79(2):1180-1190.

- Martins P. 2003. Impacto económico de las enfermedades avícolas de la lista “A” de la OIE. En: II Seminario Internacional Influenza Aviar y Enfermedad de Newcastle “Estandarización de Criterios Sanitarios para el Comercio” del 13-15 agosto. Lima –Perú.
- Martin JJ, Holguera J, Sanchez-Felipe L, Villar E, Muñoz-Barroso I. 2012. Cholesterol dependence of Newcastle disease virus entry. *Biochim Biophys Acta*. 1818:753-761.
- Mast J, Demeestere L. 2009. Electron Tomography of negatively stained complex viruses: application in their diagnosis. *Diagn Pathol*. 4: 1-7.
- Maho A, Boulbaye N, Etobia J. 2000. La Enfermedad de Newcastle y la parasitosis en la cría familiar en el sur de Chad. Laboratorio de Investigación Veterinaria y Zootecnia de farcha. *INFDP Newsletter* vol.10 Nro, 1 y 2. Ene-Jul 2000.
- Mazija H, Cajavec S, Ergotic N, Ciglar-Grozdanic I, Gottstein Z, Ragland WL. 2010. Immunogenicity and safety of Queensland V4 and Ulster 2C strains of Newcastle disease virus given to maternally immune, newly hatched chickens by nebulization. *Avian Dis*. 54: 99-103.
- Morales O, 1995 Consideraciones sobre el control de la enfermedad de Newcastle de las aves, IV Congreso Nacional de Avicultura.
- Miller, P; Afonso, C; Spackman, E; Scott, M; Pedersen, J; Senne, A; Brown, J; Fuller, C; Uhart, M; Karesh, W; Brown, I; Alexander, D y Swayne, D. 2010. Evidence for a new Avian Paramyxovirus Serotype-10 Detected in Rockhopper Penguins from the Falkland Island. *J. Virol.*, 84 (21), 11496-11504.
- Miller PJ, Guss K. Newcastle Disease. 2012. In *Diseases of Poultry*, 13th eds. Swayne DE, Glisson JR, McDougald LR, Nolan LK, Suarez D, Nair V. Iowa. USA. Wiley-Blackwell. 89 p.
- Monroy J. 2000. Epidemiología de la Enfermedad de Newcastle Velogénica Viscerotrópica. Curso: Enfermedad Emergentes: Enfermedad Emergente de Newcastle. México. D.F. Julio 14. 12-16 p.

- Moro RL, Montassier HJ, Pinto AA. 2000. Detection and Quantification of Antibodies to Newcastle Disease Virus in Ostrich and Rhea Sera Using a Liquid Phase Blocking Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 940–944 p.
- Murphy, F.A.; Gibbs, E.P.J.; Horzinek, M.C. y Studdert, M.J. (1999). Paramyxoviridae. In: *Veterinary Virology*, Chapter 26, 3ra. Ed. Academic Press, Inc., 405-458 p.
- [OIE] Office International des Epizooties. 1999. Official acts. Resolution No. XIII- Newcastle Disease. *Office International des Epizooties Bulletin*, 111:266-267.
- [OIE] Oficina Internacional de Epizootias. 2004. Newcastle disease. In: *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*, 5ª ed.
- [OIE] Office International de Epizooties. 2008. Enfermedad de Newcastle. [Internet], [7 agosto 2013]. Disponible en: http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es_2008/2.03.14.%20Enfermedad%20de%20Newcastle.pdf
- [OIE] Office International de Epizooties. 2011. Newcastle disease Terrestrial Animal Health Code. 10.13. OIE. Paris.
- [OIE] Office International de Epizooties. 2012. Código Sanitario para los animales terrestres. 621-633 p.
- Otim M, Mukiibi G, Christensen H, Bisgaard M. 2005. Immune response too Newcastle disease vaccination of free-range village chickens experimentally veterinary poultry congress. 22-26 august. Istambul-Turkey. 224 p.
- Panigrahy B, Senne DA, Pearson JE, Mixson MA, Cassidy DR. 1993. Ocurrance of velogenic viscerotropic Newcastle disease in pet and exotic birds in 1991. *Avian Dis*. 37:254-258.
- Pearson GL, Mccann MK. 1973. The role of indigenou wild, semidomestic, and exotic birds in the epizootiology of velogenic viscerotropic Newcastle disease in Southern California. *Journal of American Veterinary Medical Association* 1975; 167(7):610-14.

- Pedersen JC, Senne DA, Woolcock PR, Kinde H, King DJ, Wise MG, Panigraphy B, Seal BS. 2004. Phylogenetic relationships among virulent Newcastle disease virus isolates from the 2002-2003 outbreak in California and other recent outbreaks in North America. *J. Clin. Microb.*, 42:2329-2334.
- Ramani RN, Kirubaharan JJ, Koteeswaran A. 2012. Confirmation of B-Cell Epitope of Nucleoprotein of Newcastle Disease Viruses by Dot-ELISA and Peptide ELISA. *J. Poult. Sci.*, 11 (5): 349-360, 2012
- SENASA, 2014. SENASA Controla la enfermedad de Newcastle en aves de traspatio. [Internet], [15 de octubre 2014]. Disponible en: <http://infosenasa.blogspot.com/2014/10/senasa-controla-enfermedad-de-newcastle.html>
- SENASA Arg, 2004. Argentina. Manual de Procedimientos Enfermedad de Newcastle. [Internet], [6 marzo 2014]. Disponible en: http://www.aviculturaargentina.com.ar/sanidad/manual_newcastle.pdf
- Sharma, J. 2012 Host Factors for Disease Resistance. In: Diseases of Poultr In Diseases of Poultry, 13th eds. Swayne DE, Glisson JR, McDougald LR, Nolan LK, Suarez D, Nair V. Iowa. USA.Wiley-Blackwell 61-70 p.
- Steel RG, Torrie JH. 1996. Bioestadística Principios y procedimientos. McGraw-Hill Interamericana de México. S.A de C.V.
- Suarez D. 2012. Newcastle Disease, other Avian Paramyxoviruses, and Avian Metaneumovirus Infections. In Diseases of Poultry, 13th eds. Swayne DE, Glisson JR, McDougald LR, Nolan LK, Suarez D, Nair V. Iowa. USA.Wiley-Blackwell. 89 p.
- Swayne, D. and Suárez, D. 2003. Highly pathogenic avian influenza. *Rev. Sci. Teach. Off. Int. Epiz.* 19: 462-482.
- Swayne DE, Beck J. 2004. Heat inactivation of avian Influenza and Newcastle disease viruses in egg products. *Avian Pathol.* 33:512-518.

- Thayer SG, Beard CW. 2008. Serologic procedures. In: A Laboratory Manual for the Identification and Characterization of Avian Pathogens, 5 L. Dufour-Zavala, ed. American Association of Avian Pathologists, Jacksonville, Florida. 229-229
- Wakamatsu N, Brown C, Kapczynski D, Seal B, King D. 2004. Experimental Virulence Assessment of exotic Newcastle disease virus from an outbreak in California during 2002-2003 for chickens, turkeys and pigeons. En: AAA/AVMA Scientific Program. July 2004. Philadelphia, Pennsylvania. 83 p.
- Walker JW, Heron BR, Mixson MA. 1973. Exotic Newcastle disease eradication program in the United States of America. *Avian Dis.*, 17:486-503.
- Ventocilla K, Icochea E, Gonzales R, González A. 2011. Presencia del Virus de La Enfermedad de Newcastle en Aves Silvestres de una Laguna Albufera Cercana a Lima.
- Westbury, H. (2001). Newcastle disease virus: an evolving pathogen. *Avian Path.* 30: 5-11.
- Westover KM, Hughes AL. 2001. Molecular evolution of viral fusion and matrix protein genes and phylogenetic relationships among the Paramyxoviridae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 21(1):128-134.
- Villegas P. 2003. La enfermedad de Newcastle: Situación actual, prevención y control. En: Primera Reunión Internacional de Sanidad Invetsa-Merial. 03 abril. Ica-Perú.
- Wise M, Suarez D, Seal B, Pedersen J, Senne D, King D, Kapczynski D, Spackman E. 2004. Development of a real-time reverse-transcription PCR for detection of Newcastle disease virus RNA in clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology. J Clin Microbiol.* 42: 329-358.
- Ziedler K, Hlinak A. 1993. Detection of antibodies against Newcastle disease virus in wild birds. *Berl Munich Tierarztl. Wochenschr.* 106(9): 302-305.

VIII.- ANEXOS

Tabla N° 1. Resultados serológicos obtenidos al día 26 del estudio (pre desafío), por las pruebas de HI (antígeno entérico y respiratorio) y la prueba de ELISA.

N°	HI ENTÉRICO	HI LA SOTA	ELISA
1	1/256	1/256	7262
2	1/128	1/256	13 462
3	1/256	1/ 256	9662
4	1/256	1/ 256	19 958
5	1/256	1/256	7051
6	1/256	1/256	10 149
7	1/256	1/256	9165
8	1/256	1/ 256	11 675
9	1/128	1/128	8015
10	1/256	1/256	8950
11	1/256	1/128	14 611
12	1/128	1/256	20 122
13	1/256	1/256	12 325
14	1/256	1/256	1313
15	1/256	1/256	10 279
16	1/ 256	1/32	5047
17	1/256	1/128	13 989
18	1/256	1/256	13 214
19	1/256	1/256	9943
20	1/256	1/256	9140

21	1/ 256	1/256	11 105
22	1/256	1/256	8646
23	1/256	1/256	12 885
24	1/ 64	1/ 32	10 073
25	1/256	1/256	7573
26	1/ 8	1/ 32	396
27	1/ 2	1/64	150
28	1/64	1/32	45
29	1/ 2	1/64	7
30	1/ 4	1/16	87
31	1/ 4	1/ 8	22
32	1/256	1/256	2179
33	1/64	1/64	11478
34	1/128	1/256	8596
35	1/256	1/256	8950
36	1/128	1/256	6171
37	1/ 256	1/256	5229
38	1/16	1/64	1609
39	1/256	1/256	4731
40	1/256	1/128	3329
41	1/256	1/256	1784
42	1/64	1/32	2246
43	1/ 256	1/128	12 064
44	1/128	1/64	5728
45	1/256	1/256	13 859
46	1/ 256	1/ 256	4229

47	1/128	1/256	3319
48	1/256	1/256	9471
49	1/128	1/256	14262
50	1/128	1/256	8493
51	1/128	1/256	5223
52	1/256	1/256	8992
53	1/128	1/256	7279
54	1/128	1/256	10 645
55	1/128	1/256	11 258
56	1/256	1/256	7169
57	1 / 2	1/256	399
58	1/128	1/256	915
59	1/256	1/256	2070
60	1/256	1/256	8348
61	1/64	1/256	12 617
62	1/256	1/256	5773
63	1/ 128	1/256	2486
64	1/32	1/256	552
65	1/128	1/256	3272
66	1/256	1/256	4043
67	1/64	1/256	23467
68	1/256	1/256	5245
69	1/ 256	1/256	10 707
70	1/256	1/256	15 193
71	1/128	1/128	1380
72	1/ 128	1/ 64	2769

73	1/256	1/256	2236
74	1/256	1/256	14 771
75	1/256	1/256	10 771
76	1/256	1/256	7474
77	1/256	1/256	10 390
78	1/256	1/256	6835
79	1/256	1/256	7532
80	1/256	1/256	6846
81	1/256	1/256	10 707
82	1/256	1/256	6505
83	1/256	1/256	7391
84	1/128	1/256	6551
85	1/256	1/256	13 199
86	1/256	1/256	13 659
87	1/256	1/256	8381
88	1/256	1/256	9884
89	1/256	1/256	9972
90	1/256	1/256	11014
91	1/256	1/64	2501
92	1/256	1/256	12 626
93	1/256	1/256	8054
94	1/256	1/256	6578
95	1/256	1/256	7485
96	1/256	1/256	10 775
97	1/64	1/64	8034
98	1/256	1/128	7235

Tabla N° 2. Resultados serológicos obtenidos al día 42 del estudio post desafío, por las pruebas de HI y la prueba de ELISA.

N°	HI ENTÉRICO	HI LA SOTA	ELISA
1	1/128	1/256	120
2	0	0	43
3	0	1/ 8	588
4	0	1/ 4	128
5	1/16	1/ 4	86
6	1/16	1/32	481
7	1/32	1/64	360
8	1/8	1/ 4	311
9	1/128	1/64	219
10	1/32	1/ 8	194
11	1/256	1/32	78
12	1/64	1/16	24
13	1/64	1/16	70
14	1/32	1/32	63
15	1/ 4	1/ 8	91
16	1/ 4	1/ 4	84
17	1/8	1/ 4	43
18	0	1/ 2	105
19	1/8	1/ 4	113
20	0	0	334
21	1/ 4	1/ 4	203

22	1/ 8	1/ 4	120
23	0	0	84
24	1/ 4	1/ 4	91
25	1/16	1/ 4	164
26	1/ 8	1/ 2	113
27	1/64	1/256	24
28	1/ 4	1/ 8	150
29	1/64	1/ 64	271
30	1/32	1/ 32	479
31	1/8	1/ 8	226
32	1/ 4	1/ 4	350
33	1/32	1/ 16	319
34	1/256	1/128	78
35	1/256	1/128	334
36	1/32	1/ 8	240
37	1/32	1/ 16	78
38	0	0	70
39	1/ 4	1/ 4	512
40	0	0	319
41	0	0	248
42	1/128	1/256	233
43	1/ 8	1/ 4	113
44	0	1/ 2	10
45	1/ 4	0	91
46	0	0	24
47	1/ 2	0	6

48	1/ 2	0	56
49	1/ 2	1/ 2	186
50	1/ 4	0	17
51	0	1/ 2	84
52	0	0	30
53	0	0	211
54	1/ 2	1/ 2	50
55	1/ 2	1/ 2	113
56	0	1/ 2	180
57	1/ 2	1/ 2	134
58	1/128	1/128	1968
59	1/128	1/ 128	5952
60	1/128	1/256	5746
61	1/128	1/ 256	11675
62	1/256	1/256	7002
63	1/128	1/256	5338
64	1/256	1/256	4569
65	1/256	1/ 256	3915
66	1/256	1/256	3124
67	1/256	1/256	4456
68	1/256	1/128	3681
69	1/256	1/256	3821
70	1/256	1/256	4877
71	1/256	1/256	6382
72	1/128	1/128	5378
73	1/ 256	1/256	5253

74	0	1/ 4	6371
75	1/32	1/64	6458
76	1/128	1/256	4781
77	1/256	1/256	1614
78	1/256	1/256	5242
79	1/ 128	1/128	4256
80	1/64	1/128	2635
81	1/256	1/128	1156
82	1/ 128	1/ 128	5862
83	1/128	1/128	3195
84	1/128	1/64	4609
85	1/256	1/256	1440
86	1/128	1/256	4503
87	1/128	1/128	3124
88	1/32	1/128	3813
89	0	0	240
90	1/64	1/16	347
91	1/16	1/ 8	324
92	1/16	1/32	95
93	1/64	1/64	74
94	0	0	74
95	0	0	174
96	0	1/ 4	41
97	1/256	1/256	4551
98	1/256	1/256	5050
